



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo da presença de polimorfismos associados à resistência de  
*P. falciparum* aos ACTs em Timor Leste

**Patrícia Duarte**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**FEVEREIRO, 2019**



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo da presença de polimorfismos associados à resistência de  
*P. falciparum* aos ACTs em Timor Leste

**Autor: Patrícia Alexandra Oliveira Duarte**

**Orientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Fátima Nogueira (PhD) IHMT**

**Coorientador: Afonso Almeida (PhD) Universidade de Timor Leste**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de  
Mestre em Parasitologia Médica

## **Agradecimento**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Fátima Nogueira por todo o tempo, atenção e conhecimento partilhado na orientação da tese.

Ao Doutor Afonso Almeida pela colaboração prestada na colheita das amostras utilizadas neste estudo, sem as quais não seria possível a sua realização.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas do mestrado por todas as vivências partilhadas e colegas de gabinete por toda a ajuda e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Um agradecimento à coordenadora do Mestrado de Parasitologia Médica Carla Sousa.

Por fim, um agradecimento especial aos meus pais e irmãos por todo o apoio.

## Resumo

Em 2016 a malária foi considerada endêmica em 91 países e apesar do decréscimo, estima-se que em 2017 terão ocorrido cerca de 219 milhões de novos casos de malária a nível mundial. Face à propagação da resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos antimaláricos disponíveis, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de terapêuticas combinadas à base de artemisinina (ACT) como tratamento da malária não complicada. Em Timor-Leste os ACTs foram implementados em 2007, sendo o artemeter-lumefantrina (AL) usado como tratamento de primeira linha da malária desde então. A resistência à artemisinina e seus derivados foi confirmada no Sudeste Asiático, por isso o risco de aparecimento e propagação de resistência à artemisinina e seus derivados tem levado a esforços no sentido de serem realizados estudos de resistência em todas as regiões endêmicas para a malária. Assim sendo estudos contínuos através do uso de marcadores moleculares que permitam a determinação de resistência aos antimaláricos são muito importantes de forma a detetar precocemente o aparecimento e evitar o alastramento de parasitas *P. falciparum* resistentes/tolerantes aos ACTs.

Neste estudo pretendeu-se otimizar a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e desenhar novos primers para detecção de polimorfismos pontuais nos genes *pfmdr2* e *pfarps10* bem como determinar a frequência de polimorfismos, nos genes *pfk13*, *pfmdr1*, *pfmdr2* e *pfarps10*, associados à resposta aos ACTs em isolados de *P. falciparum* provenientes de Timor-Leste. As amostras utilizadas foram recolhidas entre 2012 e 2013, correspondendo a um período depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste. Os polimorfismos nos codões 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1*, no gene *pfmdr2* os codões 423, 484, 492 e por último no gene *pfarps10* o codão 127 foram analisados através de amplificação de DNA pela técnica de PCR e sequenciação.

Em relação ao gene *pfmdr1* verificou-se uma prevalência do alelo selvagem (*wild-type*) N86 (85%), assim como nos alelos F184 (54,2%) e D1246 (100%). Em relação ao gene *pfmdr2* para os codões 484 e 492 mantém-se esta tendência (T484 81,8%; I492 90,9%), já no codão 423 o alelo mais prevalente é 423Y, mutante (81,8%). Por último, no gene *pfarps10* apenas se verificou a presença do alelo selvagem (V127 100%).

Assim sendo é extremamente importante manter uma vigilância molecular sobre o país uma vez que este se encontra numa fase de pré-eliminação da doença.

Palavra-chave: Malária, Timor-Leste, ACT, *pfk13*, *pfmdr1*, *pfmdr2*, *pfarps10*.

## Abstract

In 2016 malaria was considered endemic in 91 countries and despite this decrease, updated estimates indicate that 219 million malaria new cases occurred globally in 2017. In view of the spread of *Plasmodium falciparum* resistance to most available antimalarials, the World Health Organization (WHO) recommends the use of combination artemisinin-based therapy (ACT) as a treatment for uncomplicated malaria. In East-Timor, ACTs were implemented in 2007, with artemether-lumefantrine (AL) being used as first-line malaria treatment ever since. Resistance to artemisinin and its derivatives has been confirmed in Southeast Asia, so the risk of emergence and spread of resistance to artemisinin and its derivatives has led to efforts to carry out resistance studies in all endemic regions to malaria. Thus, continuous studies through the use of molecular markers that allow the determination of resistance to antimalarials are very important in to monitor the emergence and avoid the spread of parasites *P. falciparum* resistant/tolerant to ACTs.

The aim of this study was to optimize the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and to design new primers to detect point polymorphisms in the *pfmdr2* and *pfarps10* genes as well as to determine the frequency of polymorphisms in the *pfk13*, *pfmdr1*, *pfmdr2* and *pfarps10* genes associated with the response to ACTs in *P. falciparum* isolates from Timor-Leste. The samples used were collected between 2012 and 2013, corresponding to a period after the introduction of ACTs in East-Timor. Polymorphisms at codons 86, 184 and 1246 of the *pfmdr1* gene, in the *pfmdr2* gene codons 423, 484, 492 and lastly in the *pfarps10* codon 127 gene were analyzed by amplification of DNA using a PCR method and sequencing.

In relation to the *pfmdr1* gene, a prevalence of the wild-type N86 (85%) was observed, as well as in the F184 (54.2%) and D1246 (100%) alleles. In relation to the *pfmdr2* gene at codons 484 and 492, this trend remains (T484 81.8%, I492 90.9%), at codon 423 the most prevalent allele is 423Y, mutant (81.8%). Finally, was only found the presence of the wild allele (V127 100%) in the *pfarps10* gene. Therefore, it is extremely important to maintain a molecular surveillance of the country once it is in a phase of pre-elimination of the disease.

Key words: Malaria, East Timor, ACT, *pfk13*, *pfmdr1*, *pfmdr2*, *pfarps10*.

## Índice

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas .....	ii
Lista de Abreviaturas .....	iii - iv
1. Introdução .....	1 - 24
1.1.Malária - Fisiopatologia .....	2 - 3
1.2.Ciclo de Vida de Malária .....	3 - 4
1.3.Distribuição Geográfica .....	5-
1.3.1. Vector .....	5
1.3.2. Parasita.....	5 - 6
1.3.3. A doença .....	6
1.4.A Malária em Timor Leste .....	7 - 8
1.5.Diagnóstico da Malária .....	9 - 10
1.6.Controlo da Malária .....	11 - 13
1.6.1. Vector .....	11 - 12
1.6.2. Vacina.....	13
1.6.3. Terapêutica .....	13
1.7.Antimaláricos Disponíveis .....	13 - 14
1.8.Resistência a Antimaláricos .....	14 - 16
1.9.Monitorização das Resistências .....	16 - 23
1.9.1. In vivo.....	16 - 17
1.9.2. In vitro .....	17 - 18
1.9.3. Marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos .....	18 - 23
1.9.3.1. <i>pfk13</i> .....	19 - 20
1.9.3.2. <i>pfmdr1</i> .....	20 - 21
1.9.3.3. <i>Plasmepsine II - III</i> .....	22
1.9.3.4. <i>pfmdr2</i> .....	22
1.9.3.5. <i>pfarps10</i> .....	23
1.10.Objectivos .....	24
2. Materiais e Métodos.....	25 - 29
2.1.Material Biológico.....	26

2.2.Extração de DNA .....	26 - 27
2.3.Desenho de primers .....	27
2.4.PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	27 - 28
2.5.Electroforese em gel de agarose .....	28 - 29
2.6.Purificação do produto de PCR .....	29
2.7.Sequenciação de DNA .....	29
3. Resultados .....	30 - 36
3.1. Características dos isolados <i>P. falciparum</i> em estudo .....	31
3.2. Características dos primers e condições de amplificação .....	32 - 33
3.3. Prevalência dos polimorfismos associados à resistência de <i>P. falciparum</i> aos ACTs .....	34 - 35
3.4. Análise de haplótipos .....	35 - 36
4. Discussão e considerações finais .....	37 - 42
5. Referências Bibliográficas .....	43 - 56

## Índice de Figuras:

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . a – Hospedeiro humano; b – Hospedeiro mosquito. (62). .....	4
<b>Figura 2</b> - Distribuição global de malária. (5) .....	6
<b>Figura 3</b> - Incidência de malária em Timor-Leste desde 2008 até ao ano de 2014 (15).....	8
<b>Figura 4</b> - Exemplos de géis de electroforese de cada gene. <b>A)</b> 1- Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 2- Fragmento de <i>Pfmdr1</i> 86/184. <b>B)</b> 3 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 4,5,6 – Poço vazio; 7 - Fragmento de <i>Pfmdr1</i> 1246. <b>C)</b> 8 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 9,10,11 – Poço vazio; 12 - Fragmento de <i>Pfmdr2</i> . <b>D)</b> 13 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 14 - Fragmento de <i>Pfarps10</i> . .....	31
<b>Figura 5</b> – Gráfico de Prevalência dos diferentes <i>SNPs</i> nos codões analisados.....	35
<b>Figura 6</b> - Prevalência dos haplótipos dos genes <i>pfmdr1</i> e <i>pfmdr2</i> .....	36



## Índice de Tabelas:

**Tabela 1** – Marcadores moleculares associados à quimio-resistência. .... 19

**Tabela 2** - Volumes e Concentrações Mistura PCR.  
..... 28

**Tabela 3** - Primers e condições de amplificação.  
..... 33

**Tabela 4** - Prevalências dos diferentes genes avaliados. .... 34

## Lista de Abreviaturas:

ACT - *Artemisin-based Combination Therapy* / Combinação de derivados da artemisinina

ADFM - Administração direcionada de fármacos em massa

AFM - Administração de fármacos em massa

AL - Artemeter + Lumefantrina (AL)

AL+PPQ – Artemeter-Lumefantrina+Piperaquina

AQ – Amodiaquina

ART – Artemisinina

AS - Artesunato

AS+AQ - Artesunato + Amodiaquina

AS+MQ - Artesunato + Mefloquina

AS+SP - Artesunato + Sulfadoxina-Pirimetamina

BP - Pares de bases

CQ – Cloroquina

DHA+PPQ - Dihidroartemisinina + Piperaquina

EC5% - concentração de fármaco que produz 5% de inibição no crescimento do parasita

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*/ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase

GMS – Região Superir de Mekong

GPI - glucose-fosfato-isomerase

HF – Halofantrina

HPLC - High-performance liquid chromatography/ Cromatografia líquida de alta eficiência

IC50 – concentração pela qual 50% do crescimento dos parasitas é inibida

IPTp - Tratamento intermitente preventivo de malária em mulheres grávidas (IPTp)

IRS - Spray residual de interiores; Pulverização de insecticidas dentro das habitações

ITN - Redes tratadas com insecticidas (ITNs)

ITPi - Tratamento intermitente preventivo de malária na infância (ITPi)

LLINs - Redes de Longa Duração Tratadas com Insecticidas

LUM – Lumefantrina

MQ – Mefloquina

WHO/OMS - World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato salino

PCR - *Polymerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase

*P. falciparum* – *Plasmodium falciparum*

*P. malarie* – *Plasmodium malarie*

*P. ovale* – *Plasmodium ovale*

PPQ - Piperaquina

PTM - Protocolo de Tratamento de Malária

*P. vivax* – *Plasmodium vivax*

QN - Quinino

RSA0-3h -

SEA - Sudeste Asiático

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* / Polimorfismo pontual

SP - Sulfadoxina-pirimetamina

TBE - Tris/Borato/EDTA

TII - Tratamento intermitente interventivo

TIIi - Tratamento intermitente interventivo crianças

TIIp - Tratamento intermitente interventivo grávidas

TNF- $\alpha$  – Factor de necrose tumoral  $\alpha$

TRD – Teste Rápido de Diagnóstico

# **1.Introdução**

### 1. Introdução

#### 1.1. Malária – Fisiopatologia

Malária é uma parasitose causada por várias espécies de *Plasmodium spp.*, sendo caracterizada por uma patologia febril aguda. Estes parasitas são transmitidos pela picada de mosquitos do género *Anopheles spp.*, sendo que os sintomas, febre, cefalias e arrepios, normalmente surgem 10 a 15 dias depois da picada. Caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente pode evoluir para malária grave, podendo levar à morte. (1) (60)

O diagnóstico e tratamento precoce é extremamente importante, pois previne consequências mais graves, reduzindo também a transmissão da mesma. (1)

A malária continua a ser uma das parasitoses mais prevalentes no mundo inteiro, com uma estimativa de 219 milhões de casos em 91 países registados em 2017, sendo que malária causou a morte a 435.000 pessoas em 2017. (22) É também a maior causa de mortalidade infantil, principalmente na África sub-sariana. (56)

Em relação ao parasita que provoca esta patologia, existem várias espécies entre elas, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), a espécie mais prevalente no continente Africano e responsável pela maioria das mortes relatadas globalmente, *P. vivax*, que se encontra principalmente fora de África Sub-sariana, existem ainda outras 3 espécies de *Plasmodium spp.* que causam malária humana: *P. malarie*, *P. ovale*, e *P. Knowlesi* menos comuns. (1) (56) (60) (61)

Ao nível da fisiopatologia da doença, infecção com malária pode resultar numa grande variedade de sintomas, desde a ausência destes a sintomas muito leves e muito pouco específicos como fadiga e febre, podendo culminar na morte. (5) (56)

Esta parasitose pode ser categorizada em malária não complicada a malária grave. Geralmente, esta pode ser uma doença curável, caso seja diagnosticada e tratada atempadamente, como referido anteriormente. (5) (56)

O mecanismo patogénico predominante na malária, resultante da fase assexuada do parasita, é a hemólise dos eritrócitos infectados. (4) Quando o parasita se desenvolve no eritrócito, várias substâncias como o pigmento de hemozoína e outros factores tóxicos acumulam na célula infectada. Estes são libertados na corrente sanguínea quando ocorre a lise da célula e são libertados os merozoítos invasivos, levando a elevados níveis de

## 1. Introdução

TNF- $\alpha$ . A hemozoína e os outros factores como a glucose-fosfato-isomerase (GPI) estimulam os macrófagos, outras células produtoras de citocinas e outros factores solúveis, que vão assim actuar na produção dos sintomas e provavelmente influenciam a gravidade da infecção. (5) (56) Para além disso, a membrana das células infectadas altera-se e contribui para a obstrução dos capilares. (4) Os eritrócitos infectados com *P. falciparum*, particularmente aqueles com trofozoítos maduros, aderem ao endotélio vascular dos vasos e não circulam livremente no sangue. (56) Quando esta sequestração acontece nos vasos do cérebro acredita-se que seja um factor determinante na síndrome de malária cerebral (causada por *P. falciparum*), que está associada a uma mortalidade elevada. (5)

### 1.2.Ciclo de Vida

Durante a refeição sanguínea, a fêmea de *Anopheles spp.* infectada injecta os esporozoítos. Após entrarem no organismo, os esporozoítos migram até ao fígado e invadem os hepatócitos. (56) (58) Atravessam assim a barreira endotelial dos hepatócitos, constituída por células endoteliais e células de Kupfer, que actuam na imunidade do indivíduo. (59) Os esporozoítos ao atravessarem esta barreira libertam proteínas que modulam a resposta celular impedindo o seu reconhecimento por parte das células de Kupfer. (58) (59)

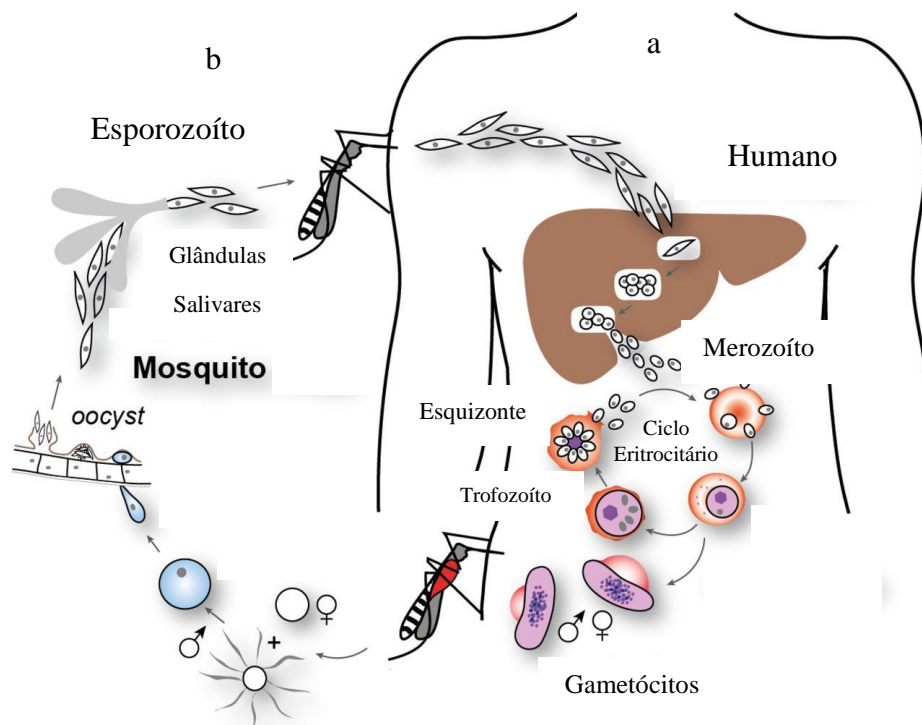
É aí, dentro dos hepatócitos que os esporozoítos replicam e se desenvolvem em vários merozoítos. Estes merozoítos saem dos hepatócitos através dos merossomas, vesículas formadas através da membrana plasmática do hepatócito no lúmen sinusoidal. Os merossomas permitem que os merozoítos escapem ao sistema imunitário do hospedeiro, evitando assim a sua destruição pelos macrófagos presentes no fígado, as células de kupffer. (58) Estes merossomas rompem-se então nos capilares resultando na libertação dos merozoítos e infeção dos eritrócitos. (58) Os merozoítos libertados na corrente sanguínea, invadem os eritrócitos e iniciam o seu ciclo replicativo assexuado,

## 1. Introdução

sendo este o estadiu sintomático da doença. (4) (60) Alguns destes merozoítos que infectaram os eritrócitos diferenciam-se nos estádios sexuais do parasita, gametócitos masculino (microgâmetas) e feminino (macrogâmetas). (60)

Os gametócitos maduros de fase V são libertados na circulação periférica e são assim ingeridos quando um mosquito faz uma nova refeição, começando aí uma multiplicação do parasita no vector que se denomina de ciclo esporogônico. Os microgâmetas, móveis, fecundam os macrogâmetas. Após a fusão dos dois é formado um zigoto diplóide, que alonga formando o oocineto. Esta forma móvel invade o intestino médio do mosquito até ao epitélio, onde é denominado de oocisto. Os oocistos entram em ciclos de replicação e ocorre a sua ruptura, libertando os esporozoítos, que migram do intestino médio para as glândulas salivares, dando assim continuidade ao ciclo dentro do hospedeiro e sendo depois libertados na saliva na próxima refeição (4)(5).

Os sintomas desenvolvem-se 4 a 8 dias depois da invasão dos eritrócitos. O ciclo replicativo dos merozoítos nas células sanguíneas dura 36 a 72 horas (até à hemólise das mesmas), causando assim febre a cada 36-72 horas, quando os eritrócitos são lisados libertando várias toxinas, como referido anteriormente. (4)



**Figura 1:** Ciclo de Vida de *Plasmodium* spp.. a – Hospedeiro humano; b – Hospedeiro mosquito. (62)

### 1.3.Distribuição Geográfica

#### 1.3.1. Vector

Existem 40 espécies de mosquitos do género *Anopheles* distribuídos por todo o planeta, inclusive no Ártico. No entanto, a eficácia da transmissão da malária depende da espécie. (4)

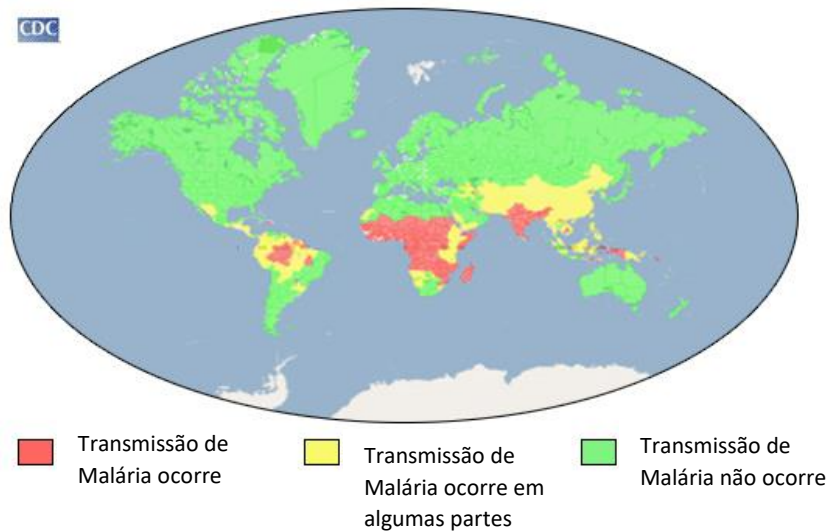
A resistência dos vectores aos insecticidas tem sido alvo de preocupação pois tem vindo a aumentar. Dos 78 países que monitorizam a resistência dos *Anopheles spp.* aos insecticidas, 60 reportaram resistência a um ou mais insecticidas desde 2010. (4) (5)

#### 1.3.2. O parasita

*P. falciparum* pode ser encontrado em todas as áreas onde existe malária. (5) Já *P. vivax* é apenas encontrado em zonas tropicais e temperadas, como o sudeste da Ásia, Etiópia e América do sul. Esta distribuição deve-se ao facto da espécie de *P. vivax* conseguir sobreviver em regiões com condições climáticas desfavoráveis e permanecer dormente na forma de hipnozoíto. (5) (60) Para além disso existe um outro factor que explica esta distribuição, pois o receptor predominante no eritrócito para *P. vivax* é relacionado ao antigénio Duffy, e a maioria das pessoas originárias de África são negativas para esse antigénio. Assim sendo esse genótipo confere protecção a infecção por *P. vivax*. (4) (60)

*P. ovale* é também encontrado na África e Ásia, mas especialmente no este de África, assim como *P. malariae*. (5) (60)





**Figura 2:** Distribuição global de malária. (5)

### 1.3.3. A Doença

Malária está presente principalmente em áreas em desenvolvimento como África, Ásia e América do Sul e Central. (4) (60)

A presença de malária depende principalmente de factores climáticos como temperatura, sendo para *P. falciparum* acima de 20°C, humidade e época de chuva. No entanto, mesmo em países endémicos tropicais e subtropicais, a transmissão não ocorre de igual forma em todas as áreas. A taxa de transmissão mais elevada ocorre em África Subsariana. (14) (60)

Malária pode causar elevada mortalidade e morbilidade, especialmente nas áreas endémicas, como a África subsariana, onde se encontra entre as causas mais frequentes de mortalidade e morbilidade entre crianças com menos de 5 anos. A OMS estima que mais de 90% das 2 milhões de mortes atribuídas a malária cada ano ocorre em crianças Africanas. (14) (60)

### 1.4. Malária em Timor Leste

Timor-Leste é um pequeno país com um território de aproximadamente 14610 Km<sup>2</sup> (23) e com uma população de 1.296.305 (22), sendo que a capital é Díli (23). Timor Leste encontra-se situado no Sudeste Asiático, onde se verifica uma alta taxa de resistência de parasitas a antimaláricos. (22)

A malária é endémica em Timor Leste. O número de casos clínicos confirmados de malária reportados no país diminuiu de 223,002 em 2006 para 16 em 2017, verificando-se uma tendência de eliminação da malária (25).

Baseado nos dados recentes de 2017, *P. falciparum* está presente em 81% e *P. vivax* em 18% (25). O pico de transmissão de malária ocorre entre Janeiro e Abril, depois da época das chuvas (72).

No período de 2000 a 2014 aconteceu um declínio de 75% na incidência de casos de malária. Por esta razão, OMS atribuiu o Programa Nacional de Controlo de Malária em Timor-Leste com o Prémio de Excelência na Saúde Pública. (15)

O país tem feito um grande esforço para manter a malária dentro de controlo e progredir para a sua eliminação. Neste país têm sido aplicados vários protocolos e programas, como o Protocolo de Tratamento de Malária (PTM) que foi alterado várias vezes consoante as edições de guidelines do governo de tratamento de malária. (24)

Em 2002 procedeu-se à primeira alteração quando se substituiu a CQ, utilizada até à data, por sulfadoxina-pirimetamina (SP), pois em 1999 foi registada a primeira resistência de *P. falciparum* à CQ. Esta continuou a ser utilizada para o tratamento de *P. vivax* (24) (17).

Depois de vários relatos de casos de *P. falciparum* com resistência tanto à CQ como à SP, o governo decidiu proceder a uma nova alteração onde passou a recomendar a utilização de ACT, artemeter+lumefantrina (AL), como primeira linha de tratamento para malária não complicada com *P. falciparum*, mantendo-se até aos dias de hoje. (24)

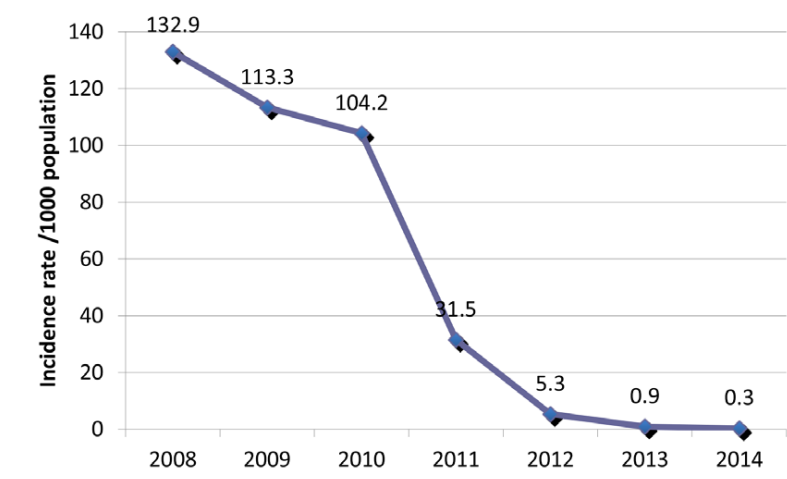
Actualmente para o tratamento dos casos em que a 1ª linha falha é usada a combinação quinino+doxiciclina, e para a malária grave AM, AS, ou QN (25).

Em 2007 foi incluída também a recomendação do uso de testes rápidos de diagnóstico (TRD), para auxiliar o diagnóstico de malária. (24)

## 1. Introdução

O Plano Estratégico do Sector de Saúde Nacional 2011-2030 pretende reduzir a mortalidade e morbilidade devido a malária, em Timor-Leste, para um nível onde não seja considerado um problema de saúde pública grave. (23) As actividades de 2008 e 2009 começaram a ter impacto logo em 2011 (16). Actualmente Timor-Leste encontra-se numa fase de pré-eliminação. Segundo o programa de Estratégia Técnica Mundial para a Malária 2016-2030, Timor-Leste é um dos países que poderá atingir a eliminação da malária até 2020 (73). No entanto esse objectivo pode ser comprometido pois recentemente confirmou-se a resistência de *P. falciparum* às artemisininas e seus derivados. (74) A monitorização da dispersão de parasitas resistentes pode ser efectuada determinando a prevalência de polimorfismos no gene *pfk13*. (2) Este gene foi considerado pela OMS como uma ferramenta auxiliar na determinação das resistências, pois permite uma monitorização e mapeamento da distribuição das resistências mais preciso. (77)

Para além disso é também importante estudar a resistência ao fármaco companheiro através de marcadores moleculares específicos pois a resistência à artemisinina e seus derivados aumenta o risco de resistência ao seu fármaco companheiro. (74) (75)



**Figura 3:** Incidência de malária em Timor-Leste desde 2008 até ao ano de 2014 (15).

### 1.5. Diagnóstico da Malária

Uma componente essencial ao sucesso do controlo e eliminação da malária é a realização de um diagnóstico e tratamento adequado dos pacientes. (27) O processo do diagnóstico, e escolha do método utilizado, é iniciado pela suspeita de malária com base num conjunto de critérios clínicos, que podem variar com o nível de endemicidade de malária e os tipos de febres de outra etiologia que não malária na área (1) (27). O diagnóstico clínico deve ser confirmado por um teste laboratorial, podendo se basear tanto numa amostra de sangue para microscopia como em testes rápidos de diagnóstico (27).

Desde 2010, a OMS recomenda a confirmação da infecção por microscopia ou teste rápido de diagnóstico (TRD) para todos os pacientes suspeitos de terem malária, antes de começar qualquer tratamento (27) (30) (60).

O tratamento apenas na base de suspeita clínica deve ser considerado apenas quando o diagnóstico parasitológico não é possível, pois o objectivo de testar uma pessoa doente com malária não é apenas confirmar a presença da infecção com *Plasmodium spp.* mas também decidir qual o tratamento apropriado. (27)

A OMS recomenda que o diagnóstico da infecção por *Plasmodium spp.* seja baseado na microscopia. (27) Esta permite a identificação das diferentes espécies de *Plasmodium spp.*. Para além disso possibilita a quantificação da densidade parasitária, de forma a monitorizar a resposta ao tratamento (1). Para descartar infecções de baixa densidade parasitária, várias lâminas de amostras de sangue devem ser examinadas em pacientes suspeitos de ter malária (29). Uma vez que é um método que requer técnicos capacitados, equipamentos em boas condições, um stock regular de reagentes, água, electricidade, e um sistema de qualidade bem executado, houve necessidade de desenvolver um teste mais simples e menos exigente, o teste rápido de diagnóstico (TRD) (27).

Os TRDs detectam antígenos específicos produzidos pelos parasitas que estão presentes no sangue de indivíduos infectados. Alguns destes testes detectam uma única espécie, outros detectam várias espécies, sendo que ainda existem novos testes que conseguem distinguir entre 2 espécies de *Plasmodium* (testes bivalentes) (29) (60). O sangue para o teste é normalmente obtido através de uma picada no dedo e os resultados

## 1. Introdução

estão disponíveis num curto período de tempo. No entanto estes são testes pouco sensíveis, pois não detectam infecções de baixa densidade parasitária, comuns nas áreas tanto de alta como de baixa transmissão (1). Embora o treino e a supervisão sejam essenciais tanto para um TRD como para microscópio, a utilização destes testes e a interpretação dos resultados requer menos experiência. (27)

Um outro método de diagnóstico disponível actualmente são os testes moleculares, como PCR, preferíveis em casos de infecções de baixa densidade, pois são os mais sensíveis e específicos. Estes detectam quantitativa ou qualitativamente a infecção. Para além disso detectam infecções múltiplas e mutações de resistência a fármacos. (1) Estes tipos de testes são especialmente utilizados em laboratórios capacitados, quando a examinação microscópica é inconclusiva. No entanto esta é uma técnica de elevado custo, onde é necessário equipamento específico, técnicos capacitados, onde podem ocorrer reacções cruzadas, contaminações entre amostras. (14) A OMS recomenda que os testes de amplificação de ácidos nucleicos, que têm como principal característica detectar infecções de baixa densidade parasitária, sejam apenas considerados para fins de pesquisa epidemiológica e mapas de pesquisa de infecções sub-microscópicas (1). Uma vez que a doença é predominante em países de baixa renda, este é um método mais difícil de implementar, no entanto seria útil a disponibilização de equipamentos necessários para a realização de PCR por parte de países de alta renda. Assim sendo este é mais utilizado como método confirmatório. (5)

Por último, a utilização da serologia é outra abordagem possível através da detecção de anticorpos anti-malária no soro dos pacientes. Marcadores serológicos específicos têm sido identificados para cada uma das espécies. (14) Estes testes não são muito utilizados pois é necessário tempo para que o anticorpo se desenvolva e persistência dos mesmo. Um teste positivo normalmente indica uma infecção passada ou crónica, assim sendo a serologia não é útil no diagnóstico de infeções agudas pois os níveis detectáveis de anticorpos *anti-Plasmodium* não são detectados durante semanas. Para além disso esta técnica é relativamente dispendiosa e não é facilmente acessível aos laboratórios das áreas endémicas, principalmente África. (14) (76)

## 1.6. Controlo de malária

O objectivo dos programas nacionais de controlo de malária é reduzir o número de casos e mortes devido a malária e, reduzir a transmissão. (5) (60) (63)

Para o controlo de malária é recomendado o tratamento e intervenções de prevenção. A escolha dessas intervenções depende do nível de transmissão de malária na área. Algumas das medidas que podem ser tomadas são:

- Monitorização dos pacientes com malária (através de diagnóstico e tratamento)
- Prevenção:
  - Redes tratadas com insecticidas (ITNs)
  - Tratamento intermitente preventivo de malária em mulheres grávidas (IPTp)
  - Tratamento intermitente preventivo de malária na infância (ITPi)
  - Spray residual de interiores (IRS)
  - Controlo de larvas e outros vectores
  - Administração de fármacos em massa e tratamento de febres em massa

Para além disso, várias companhias e grupos estão a desenvolver uma vacina para malária, mas até agora não existe nenhuma vacina eficiente no mercado. (5) (60) (63) Actualmente a única vacina aprovada para uso humano é a RTS,S, que ainda se encontra a ser avaliada como uma ferramenta adicional de controlo de malária. (65)

### 1.6.1. Vector

O controlo do vector, que consiste principalmente na utilização de insecticidas e redes, tem como objectivo prevenir e reduzir a transmissão da malária sendo uma ferramenta importante. (1) (60)

## 1. Introdução

Redes tratadas com insecticidas (ITNs) são uma forma de protecção pessoal mais utilizada, reduzindo a exposição a picada dos mosquitos, e consequentemente a transmissão. Estas redes formam uma barreira protectora à volta das pessoas que dormem debaixo delas. (60) (63) (64)

As redes e insecticidas, como os piretroides, insecticida aprovado para as redes mostraram ter baixos riscos para a saúde humana e de outros mamíferos, mas tóxicos para os mosquitos. Estas redes têm de ser tratadas a cada 6 meses ou 1 ano. O custo adicional do insecticida e da falta de compreensão da importância deste tratamento resulta numa taxa bastante baixa de re-tratamentos das redes em África. (5) (60) (63) (65) As redes de Longa Duração Tratadas com Insecticidas (LLINs) mantêm os níveis eficientes de insecticida pelo menos durante 3 anos, mesmo após lavagens repetidas. LLINs têm sido associadas a grandes declínios da prevalência da infecção por malária em países onde os programas para malária alcançaram uma grande cobertura de LLIN. A OMS recomenda que as LLINs sejam distribuídas gratuitamente e utilizadas por todas as pessoas que vivem em áreas endémicas. (5) (60) (63) (65) Muitos vectores da malária são considerados endofílicos, ou seja, o mosquito permanece dentro das habitações depois da sua refeição. Estes mosquitos são especialmente susceptíveis ao controlo através da pulverização de insecticidas dentro das habitações (IRS). (5) (64) A IRS envolve um revestimento das paredes e outras superfícies da casa com insecticida residual. O insecticida vai eliminar os mosquitos e assim prevenir a transmissão da infecção. (5) (60)

Pode ainda ser efectuado o controlo larvar. A OMS recomenda controlo larvar como apropriado para áreas onde os habitats larvares são poucos, fixos e localizáveis. Este controlo pode também ser implementado através de control biológico, como por exemplo a utilização de fungos. (63)

A pulverização é utilizada em situações de emergência como epidemias. A pulverização deve ser utilizada na época do pico da actividade do mosquito, pois os mosquitos em descanso são normalmente encontrados em áreas que dificultam o alcance do insecticida (5).

Actualmente, a introdução de machos estéreis em determinadas áreas tem sido aplicada com sucesso. No entanto, a necessidade de libertar um grande número de mosquitos torna esta prática difícil. (5)

### 1.6.2. Vacina

Embora tenha sido feito um progresso nos últimos 10 anos para o desenvolvimento de vacinas, ainda não existem vacinas eficientes disponíveis contra a malária no mercado. (5)

*Plasmodium spp.* tem um ciclo de vida bastante complexo, bem como é complexa a resposta imune do hospedeiro à infecção. A exposição ao parasita não confere protecção a longo-prazo. A imunidade adquirida apenas protege parcialmente contra doença futura, por outro lado a infecção pode persistir durante meses sem sintomas de doença. (5)

Actualmente existem mais de 20 vacinas candidatas em vários estadios de desenvolvimento, no entanto a vacia RTS,S/ AS01 (RTS,S) é a mais avançada. (60) (65) Esta vacina tem como alvo uma proteína de *P. falciparum* e mostrou ser segura, no entanto apenas apresenta uma eficácia moderada, com 30% de protecção contra a malária clínica e 26% de protecção contra a malária severa, ou seja, apenas confere uma protecção parcial. (60)

### 1.6.3. Terapêutica

Os antimaláricos são usados como profiláticos e para tratamento de infecção, sendo que, os fármacos utilizados para prevenção não devem ser os mesmos do tratamento de primeira linha na mesma região. (4) A a resistência a *P. falciparum* aos antimaláricos sucessivamente introduzidos no mercado tem-se tornado um grande obstáculo ao controlo e eliminação da malária. (6)

## 1.7. Antimaláricos Disponíveis

Em 2006 a OMS passou a recomendar a utilização de terapias combinadas baseadas na artemisinina (ACTs) como primeira linha de tratamento para malária não complicada por *P. falciparum*. (35) (66)



## 1. Introdução

ACT é uma combinação de um derivado de artemisinina (que actua matando rapidamente os parasitas) com um fármaco de actuação mais lenta. Assim, o componente de artemisinina elimina rapidamente a maioria dos parasitas sendo também activo contra os estadios sexuais do parasita, reduzindo a sua transmissão ao mosquito vector. O fármaco associado (de semivida mais longa e actuação mais lenta) elimina os parasitas residuais. (33) (60) Ao matar rapidamente um grande número de parasitas, reduz a probabilidade de a população desenvolver mutações e assim conferir resistência ao fármaco companheiro. (2) (60)

Os ACTs recomendados para o tratamento de malária não complicada são:

- artemeter + lumefantrina (AL)
- artesunato + amodiaquina (AS+AQ)
- artesunato + mefloquina (AS+MQ)
- artesunato + sulfadoxina-pirimetamina (AS+SP)
- dihidroartemisinina + piperquina (DHA-PPQ) (33)

Fármacos que previnem a invasão ou proliferação de *Plasmodium spp.* no fígado têm uma actividade profilática, já outros que bloqueiam os estadios eritrocitários são utilizados como tratamento da fase sintomática da doença, e os componentes que inibem os gametócitos ou o seu desenvolvimento no mosquito são agentes bloqueadores de transmissão. (4)

### 1.8. Resistência a Antimaláricos

Segundo a OMS, a resistência a antimaláricos é definida como a capacidade uma que população de parasitas tem de sobreviver ou se multiplicar, mesmo que tenha sido administrado e absorvido um fármaco, em doses iguais ou superiores àquelas que normalmente são recomendadas no intervalo de tolerância do indivíduo. O fármaco em questão deve ter acesso ao parasita ou à célula infectada durante o tempo necessário para a sua acção normal (33) (14). Já a resistência parcial aos derivados da artemisinina consiste num atraso na eliminação do parasita após um tratamento com um derivado de artemisinina em monoterapia ou como ACT. Pode ainda ocorrer resistência a mais de 2 antimaláricos de diferentes classes químicas (34). Por último a falência terapêutica ocorre

## 1. Introdução

quando não existe capacidade de eliminar os parasitas do sangue do indivíduo, depois da administração de um determinado antimalárico. Existem vários factores que podem contribuir para a falência terapêutica, como a administração de uma dose incorrecta de fármaco, baixa qualidade do mesmo, resistência, má absorção, entre outros. (34)

Normalmente, a resistência surge de mutações espontâneas que conferem a redução da sensibilidade do parasita ao fármaco. Para alguns fármacos, basta uma mutação pontual para adquirir resistência, enquanto que para outros é necessário que surjam várias mutações para se dar esse fenómeno. A pressão do fármaco vai remover os parasitas susceptíveis enquanto que os resistentes vão sobreviver. (14) Parasitas causadores de novas infecções, ou parasitas de infecções que não foram totalmente eliminadas, serão expostos a níveis de fármacos suficientemente elevados para exercer pressão selectiva, mas insuficientes para proporcionar protecção profilática. (5)

A resistência aos ACTs actualmente disponíveis foi identificada apenas no sudeste Asiático e em *P. falciparum*. Não existem relatos de desenvolvimento de resistência por parte de *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale* a algum antimalárico. (67) (68)

Actualmente a OMS recomenda a monitorização da eficácia da primeira e segunda linha de ACT's a cada 2 anos em todos os países endémicos para malária de *P. falciparum*. Se a taxa de positividade, ao 3º dia, for superior a 10% da taxa de eliminação do parasita estudado, deve ser conduzida a confirmação da eliminação retardada e deve ser efectuada a genotipagem de genes associados a resistência, como *pfK13*, para avaliar a presença de mutações de resistência associadas e validadas. (2)

A resistência de *P. falciparum* a artemisinina (ART) surgiu no Camboja, em 2009 (69), e consequentemente espalhou-se para a Região Superior de Mekong (GMS) no Sudeste Asiático (SEA). Recentemente foi notificada resistência também em África. (6) Contudo, no Sudeste Asiático, a sensibilidade do parasita aos agentes de artemisinina diminuiu, e foram reportados polimorfismos no gene *pfk13* associados a essa diminuição. (7)

O aumento da resistência à ART e PPQ na mesma população de parasitas motivou o começo do uso de terapia combinada tripla em alguns locais endémicos para malária onde a eficácia dos ACTs diminuiu. (11)

A resistência a ART coloca uma grande ameaça ao controlo da malária, para isso devem ser instauradas medidas de controlo rigorosas. (60)

## 1. Introdução

No caso de Timor Leste ainda não existem resistências confirmadas aos ACTs, no entanto este encontra-se localizado numa região propensa à aquisição de resistências. Uma vez que se encontra numa fase de pré-eliminação é de suma importância manter a vigilância sobre o surgimento de novas resistências na região. (22)

### 1.9. Monitorização das Resistências

O futuro da eficácia dos ACTs está comprometido pela emergência de resistência a artemisinina e aos fármacos companheiros. (22) Segundo a OMS, monitorizar a eficácia terapêutica dos antimaláricos disponíveis é um factor determinante para o programa de vigilância. Para além disso actua como ferramenta orientadora de política terapêutica da malária, em que é recomendado a mudança de tratamento de primeira linha quando a taxa de falência é superior a 10% dos casos tratados. (2) (9) Os métodos laboratoriais para monitorizar essa eficácia incluem testes *in vitro* e caracterização molecular, utilizando marcadores moleculares para a monitorização da sensibilidade dos parasitas a alguns fármacos. (5) (9)

#### 1.9.1. Métodos In Vivo

Os testes *in vivo* baseiam-se na resposta clínica e parasitológica de um grupo de indivíduos sintomáticos e parasitémicos infectados com *P. falciparum*, num período de tempo definido, aos quais é administrado doses padrão do fármaco avaliado e consequente monitorização ao longo do tempo. (14)

O procedimento destes testes assim como os resultados devem seguir um protocolo, anteriormente estabelecido pela OMS.

## 1. Introdução

Os resultados dos testes de eficácia terapêutica para ACTs são usados no tratamento de *P. falciparum* permitem a determinação de:

- Proporção de pacientes que são parasitémicos no dia 3, que é actualmente um indicador de escolha para monitorização de rotina para identificar resistências parciais de *P. falciparum* à artemisinina.
- Proporção de falência do tratamento no dia 28 ou 42 (de acordo com a semi-vida do fármaco companheiro do ACT) (77)

O tempo de acompanhamento clínico e parasitológico é no mínimo 28 dias (42 nos casos acima mencionados), e recomenda-se a genotipagem por PCR para distinção entre recrudescência e reinfeção. (78)

Estes testes refletem de uma forma mais real as situações clínicas e epidemiológicas. No entanto devido à influência de factores externos incontrolláveis os resultados retratam verdadeiramente o nível de resistência a antimaláricos, por isso não são a escolha ideal. (14)

### 1.9.2. Métodos In Vitro

Os ensaios in vitro são utilizados para monitorar a resistência a fármacos medindo a sensibilidade intrínseca de parasitas *P. falciparum* aos antimaláricos. Baseiam-se na cultura de parasitas expostos a concentrações de fármacos, observando-se assim qual a sua resposta. (5) (35)

Estes testes oferecem uma abordagem mais objectiva na determinação da resistência do parasita, uma vez que são baseados no contacto directo dos parasitas com as concentrações aumentadas de fármaco. (35) Ao contrário dos estudos de eficácia terapêutica, os testes *in vitro* conseguem obviar os factores de confusão relacionados com o hospedeiro. (35) Para além disso, vários testes podem ser realizados com a mesma amostra, e vários fármacos podem ser testados ao mesmo tempo, incluindo fármacos que estão ainda na fase experimental. (14) (35) (37)

Estes ensaios permitem o estudo de resistência cruzada entre antimaláricos, estabelecer a sensibilidade basal de um fármaco monitorando a sua evolução,

## 1. Introdução

monitorização espacial e temporal da susceptibilidade do parasita ao antimalárico e ainda a validação de marcadores moleculares (35)

Esses resultados normalmente são expressos como a concentração pela qual 50% do crescimento dos parasitas é inibida ( $IC_{50}$ ), obtendo-se um valor quantitativo de susceptibilidade. (35) Estipula-se que para os derivados de ART se use o RSA ( *ring-stage survival assay* ) como medida de susceptibilidade *in vitro*, pois os valores de  $IC_{50}$  são semelhantes tanto na nas populações de *P. falciparum* resistentes como nas sensíveis (6) (11) (80). O RSA mede a sobrevivência de parasitas entre as 3 e 9h após invasão, depois de terem sido exposto a uma dose de fármaco (6) (11) (79) (80).

### 1.9.3. Marcadores Moleculares de Resistência aos Antimaláricos

A caracterização de marcadores moleculares de resistência é um aspecto importante da compreensão da resistência ao tratamento antimalárico (34) (35). Estes marcadores baseiam-se na presença de mutações genéticas que conferem resistência a um determinado fármaco utilizado no tratamento da malária (35).

A vigilância sistemática da prevalência de marcadores moleculares de resistência constitui uma ferramenta de detecção de resistências precocemente, servindo também como um complemento dos resultados de outros testes (*in vivo e in vitro*). Para além disso contribui para a tomada de decisões sobre políticas terapêuticas eficazes para o controlo da doença (81) (82).

Uma vez identificadas as mudanças genéticas associadas a resistência, esta pode ser confirmada com técnicas moleculares (14) (34) (35).

A frequência com que ocorrem mutações genéticas específicas em amostras de parasitas obtidos de pacientes de uma certa área pode dar uma indicação da frequência de resistência ao fármaco naquela área. (14)

Existem já alguns genes identificados que envolvidos na resistência de *P. falciparum* a alguns antimaláricos apresentados na tabela 2. (17) (36) Enquanto tem havido algum sucesso na identificação de marcas moleculares de resistência, é necessário fazer mais pesquisas para identificar aqueles para outras drogas antimaláricas, em particular artemisininas. (35) (34) Neste trabalho vamos nos debruçar essencialmente sobre os marcadores moleculares associados aos fármacos

# 1. Introdução

que pertencem à classe dos ACTs.

**Tabela 1:** Marcadores moleculares associados à quimio-resistência.

Antimalárico	Marcador	Associação
<b>Cloroquina</b>	<i>pfcr</i>	Alta
	<i>pfmdr1</i>	Ocasional
<b>Quinino</b>	<i>pfcr</i> , <i>pfmdr1</i> , <i>pfh</i>	Ocasional
	<i>pfmrp1</i>	Ocasional
<b>Amodiaquina</b>	<i>pfcr</i> , <i>pfmdr1</i>	Ocasional
<b>Mefloquina</b>	<i>pfmdr1</i> – nº de cópias	Alta no Sudeste Asiático
<b>Piperaquina</b>	<i>pfcr</i>	Ocasional China
	<i>Plasmepsine 2</i> (nº de cópias)	Alta Camboja
<b>Lumefantrina</b>	<i>pfcr</i> , <i>pfmdr1</i>	Ocasional
<b>Atovaquona</b>	<i>Pf</i>	Alta
<b>SP</b>	<i>pf</i> , <i>pf</i>	Alta
<b>Artemisinina</b>	<i>pfk13</i>	Alta

## 1.9.3.1. *pfK13*

O gene *pfk13* (gene PF3D7\_1343700) codifica uma proteína do tipo *Kelch*, estas respondem ao stress oxidativo. (3) Os derivados da artemisinina são drogas pro-oxidantes, então concluiu-se que as mutações do gene *pfK13* medeavam a resistência à artemisinina (3). Nos parasitas resistentes, as mutações do gene previnem e bloqueiam o factor de transcrição de *pfK13*, conduzindo a um padrão de expressão do gene que prepara os parasitas para as consequências da oxidação repentina causada pelas artemisininas, conferindo assim resistência. (3). O gene *pfK13* é essencial para a vigilância molecular dos parasitas de malária com resistência a artemisinina (ART). Até agora foram reportadas mais de 150 mutações não sinónimas neste gene. (6) Algumas das mutações de *K13* associadas a resistência de artemisinina são P441L, F446I, G449A, N458Y,

## 1. Introdução

C469F, P527H, N537I, A481V, Y493H, G538V, R539T, I543T, P553L, R561H, V568G P574L, C580Y, F673I, M476Y e A675V, no entanto apenas algumas estão validadas *in vivo* e *in vitro*: F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H e C580Y (70) (77).

Os genótipos do gene *pfK13* foram recentemente utilizados para redefinir a definição de resistência a artemisinina. Actualmente casos suspeitos de resistência são definidos como uma alta prevalência no fenótipo parasitário de eliminação retardada, ou uma alta prevalência de mutações do gene *pfK13*, e a confirmação da resistência é definida como a combinação de ambos os factores acima referidos num único indivíduo. (2)

A mutação A578S, que é mais frequentemente encontrada em África e em vários países de SEA, e verificou-se que não estava associada à resistência clínica a ART. (6)

A mutação C580Y teve um aumento rápido na prevalência onde a resistência a artemisinina se tornou comum no ocidente de Cambodja, e as mutações C580Y, Y493H e R539T estavam associadas com uma eliminação de meia-vida de parasita longa e elevaram a taxa de sobrevivência no RSA0-3h. (3)

### 1.9.3.2. *pfmdr1*

O gene *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1/gene de resistência a múltiplos fármacos 1; PF3D7\_0523000) tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como CQ, QN, MQ, ART e derivados, podendo assim modular a sua susceptibilidade por dois mecanismos, sendo eles a amplificação génica e/ou mutações na sua sequência. (10) (12) Este gene é um transportador trans-membranar ABC que codifica para a proteína homóloga Pgh1. (12) (83)

Na sensibilidade a antimaláricos *pfmdr1* actua como um transportador activo de solutos. Os polimorfismos neste gene são conhecidos por alterar a ligação ao fármaco, permitindo o fluxo de solutos para o vacúolo alimentar do parasita, e permite assim que a resistência se desenvolva. (8)

A amplificação de *pfmdr1* tem sido associada à diminuição da susceptibilidade do *P. falciparum* à artemisinina e seus derivados, assim como a presença de determinados SNPs no gene, nomeadamente nas posições 86, 184, 1034, 1042 e 1246. (8) (12) (83)

## 1. Introdução

O aumento do número de cópias deste gene é especialmente comum no Sudeste Asiático, e é fortemente associado com a falência de terapêutica a MQ e LUM. (12)

Vários estudos sugerem que o polimorfismo N86Y do gene *Pfmdr1* é um potencial marcador para a resistência a CQ, sendo que a sua variante selvagem é altamente selecionada depois da falha do tratamento com AL. (6) (43) Este polimorfismo foi também anteriormente associado com um IC<sub>50</sub> mais baixo para artemisinina e dihidroartemisinina quando comparados com o alelo selvagem (47).

Segundo alguns autores o polimorfismo Y184F pode desempenhar um papel na mediação da resistência a vários outros fármacos. (6) Também os SNPs 86Y 1034C, 1042D, 1246Y têm sido significativamente associados com o aumento dos valores de IC<sub>50</sub> a artemisinina e seus derivados. Para além disso verificou-se que a alteração nestes polimorfismos conferia resistência contra quinino (QN) e um aumento da susceptibilidade a MQ, halofantrina (HF) e artemisinina. (9) (12) Particularmente, os alelos selvagens N86 e D1246 do gene *pfmdr1* têm sido associados com a diminuição da sensibilidade a LUM, pois um aumento na prevalência de N86, 184F e D1246 de *pfmdr1* tem sido observado em infecções recorrentes que surgiram depois do tratamento com AL. (9)

É importante realizar igualmente uma análise de haplótipos, sequência de alelos num gene, para ter uma visão mais abrangente das interações entre alelos e consequentemente detectar associações entre o fenótipo observado e o haplótipo (9). O haplótipo N86, 184F e D1246 (NFD) é selecionado pelo tratamento com AL, enquanto 86Y, 184Y e 1246Y (YYY) é selecionado pelo uso de AQ ou CQ. (9) A redução da susceptibilidade a LUM e MQ tem estado também ao haplótipo NFD seguido dos haplótipos NYD, YYY e YYD (42) (44) (47). O haplótipo YFD de *pfmdr1* está associado com o aumento da susceptibilidade do parasita a derivados de artemisinina, MQ, HF e LUM.

Assim sendo, é importante vigiar as alterações nas prevalências desses SNPs de forma a obter um alerta precoce na emergência e dispersão de parasitas resistentes aos ACTs. (12) (83)



### 1.9.3.3. *Plasmepsine – II e III*

Marcadores genéticos foram associados com a resistência a piperquina como o aumento do número de cópias de alguns genes, neste caso *plasmepsina II* e *III*, que contribuem para a digestão da hemoglobina no parasita (38) (39) (85). A associação da resistência a piperquina com o aumento do número de cópias de *plasmepsina II-III* foi observado, no entanto a análise funcional permanece desconhecida de como estas mudanças contribuem para a resistência a piperquina (38) (39). Estes polimorfismos estão implementados como marcadores de vigilância da resistência, no entanto são necessários mais estudos para descobrir a base molecular da resistência a piperquina. (39)

### 1.9.3.4. *pfmdr2*

O papel do gene *pfmdr2* (*P. falciparum multidrug resistance 2*/transportador de resistência múltipla 2; PF3D7\_1447900 ), na resistência a antimaláricos permanece pouco conhecido, mas a proteína codificada tem sido implicada na resistência a fármacos antifolatos e à tolerância a metais pesados, como o cádmio. (37) O gene em questão é um gene transportador que codifica a glicoproteína-P semelhante à codificada por *pfmdr1*. (52)

O aumento da transcrição de *pfmdr2* foi observado em parasitas resistentes à CQ (52), e o polimorfismo F423Y deste gene parece estar também associada com o efluxo de pirimetamina de fora do parasita. (52) (55)

Segundo alguns autores, como *pfmdr2* se localiza na membrana plasmática do parasita, a deleção deste gene iria resultar numa acumulação de substrato de antimaláricos no parasita, levando a um fenótipo de sensibilidade aumentada. Assim o gene *pfmdr2* pode prevenir essa acumulação, resultando numa sensibilidade reduzida a MQ e QN, no entanto esta hipótese ainda não é muito clara. Já a variante mutada do gene não mostra a mesma tendência à sensibilidade do *P. falciparum* à LUM, podendo indicar que LUM não é um substrato para *pfmdr2*, ou tem um local de acção diferente (54).

### 1.9.3.5. *pfarps10*

O gene *pfarps10* (*Plasmodium falciparum* apicoplast ribosomal protein S10; PF3D7\_1460900.1) de *P. falciparum* codifica uma proteína do apicoplasto que afecta a produção de moléculas essenciais à sobrevivência do parasita. (36)

Segundo alguns estudos, o complexo proteico ribossomal apicoplástico tem sido proposto como o alvo de alguns antibióticos como clindamicina e tetraciclina que têm sido utilizados como antimaláricos. (36) Alguns parasitas demonstraram sensibilidade diminuída a estes fármacos, um fenótipo associado com a acção específica do apicoplasto, que ao sofrer mutações pode desencadear resistência. (84) Sendo esta uma descoberta relativamente recente são necessários mais estudos para conhecer qual a influência dos polimorfismos neste gene na resistência a antimaláricos.

Recentemente alguns *SNPs* no gene *pfarps10* foram associados com um atraso na eliminação dos parasitas depois do tratamento com ACT. (52)

### 1.10. Objetivo geral

Estudar a presença de polimorfismos associados à resistência de *P. falciparum* aos ACTs em Timor Leste.

#### Objetivos específicos

1 – Desenho e optimização do PCR para detecção para polimorfismos pontuais nos genes *pfmdr2* e *pfarps10*.

2 - Determinar a presença de polimorfismos pontuais nos genes *pfK13*, *pfmdr1*, *pfmdr2* e *pfarps10* de *P. falciparum* em amostras provenientes de Timor-Leste.

# **2. Material e Métodos**

## 2. Material e Métodos

Os procedimentos e inclusão das amostras/isolados objecto do presente trabalho obtiveram parecer favorável do Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) com o Parecer nº 09-2016.

### 2.1. Material biológico

O material biológico objecto destudo consistiu em amostras de DNA total, extraído de sangue em papel de filtro, de pessoas com diagnóstico parasitológico de infecção por *P. falciparum* provenientes da República Democrática de Timor-Leste. As amostras foram recolhidas entre 2012 e 2013, depois da introdução dos ACTs (em Timor-Leste), no contexto do estudo de prevalência de malária levado a cabo pelo Programa Nacional de Controlo de Malária de Timor-Leste. As amostras foram enviadas para o IHMT sob a forma de gotas de sangue seco em papel de filtro. Estas resultaram de 2-6 gotas de sangue do tubo de hemograma (colhido para fins de diagnóstico do paciente) após confirmação de diagnóstico positivo para *P. falciparum*. As amostras encontravam-se identificadas por sexo e ano de colheita.

### 2.2. Extracção de DNA

No início do nosso trabalho, parte destas amostras já se encontravam sob a forma de DNA total e conservadas a -20°C.

O DNA genómico total das restantes amostras bem como os controlos, o clone 3D7 de *P. falciparum* proveniente de culturas *in vitro*, foi extraído com recurso ao método de extração com Chelex-100 (Kain *et al.*, 1991). Foi cortada uma pequena parte do papel que continha a gota de sangue com a ajuda de uma tesoura e uma pinça, previamente imersas em lixívia e água, sendo colocada num tubo *ependorf* de 1,5 mL. Para hemolisar os eritrócitos parasitados adicionou-se 1 mL de solução de 0,5% de saponina em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*), e deixou-se essa mistura em incubação a 40°C, durante

a noite. Após esta incubação realizou-se uma lavagem com PBS e nova incubação a 40°C por 30 minutos. A extração foi então feita através da adição de 50 µL de solução de Chelex em Água Milli-Q a 20% e 150 µL de água esterilizada. Em seguida, colocaram-se todos os tuos eppendorf num bloco quente a 100°C durante 15 minutos, tendo sido feita de seguida uma centrifugação (14000rpm/2min), com o objectivo de separar o precipitado que continha os componentes que não eram necessários, do sobrenadante que tinha o DNA. Por fim, esse DNA extraído foi colocado em alíquotas a -20°C preservando o mesmo até à sua amplificação.

### 2.3.Desenho de primers

Para a amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *pfarps10* (ID PF3D7\_1460900.1) *pfmdr2* ( ID PF3D7\_1447900) foi necessário desenhar primers cuja sequencia se encontra na Tabela 3, capítulo dos resultados, tendo em conta as considerações seguintes: a) Temperatura de dissociação do par primer/sequência alvo; b) Conteúdo em Guanina/Citosina (G/C); c) Complementaridade da sequência do primer; com recurso ao *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>); d) Localização das mutações, de forma a ficarem no meio; e) Tamanho das sequências dos primers.

### 2.4.PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Para confirmação de espécie de *Plasmodium spp.* presente na amostra foi realizado o protocolo descrito por Snounou *et. al*, 1993. Assim sendo fez-se uma primeira reacção para determinação do género e uma segunda para determinar qual a espécie presente na amostra.

Para realizar a amplificação dos vários fragmentos de interesse nos diferentes genes, *pfmdr1*, *pfk13* utilizou-se os protocolos de PCR descritos anteriormente em (Lobo et al.,2014) (48) e (Escobar et al.,2015) (49) com algumas alterações. As

### 3. Materiais e Métodos

condições de amplificação dos fragmentos de *pfmdr2*, *pfarps10* encontram-se detalhadas nas tabelas 1 e 2.

A mistura de reacção Master Mix (*ThermoScientific* PCR Master Mix (2X)) foi realizada de forma a obter um volume final de 20  $\mu$ L para a 1ª reacção e de 25  $\mu$ L para a 2ª reacção. Todas as reacções continham um controlo positivo e um branco (amostra sem DNA). Os detalhes dos volumes e reagentes utilizados na mistura de reacção estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Volumes e Concentrações Mistura PCR.

<i>Reagentes</i>	<i>Volume 1ª Reacção</i> ( $\mu$ L)	<i>Volume 2ª Reacção</i> ( $\mu$ L)	<i>Concentrações</i>
<i>Master Mix</i>	10	12,5	2X
<i>Primer Foward</i>	0,4	0,4	300 nM
<i>Primer Reverse</i>	0,4	0,4	300 nM
<i>H2O</i>	7,2	10,7	-
<i>DNA</i>	2	1	-
<i>Total</i>	20	25	-

#### 2.5. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram separados numa tina horizontal que continha tampão TBE 1x, preparado previamente de uma solução com concentração de 10x com 1M Tris, 1M de Ácido Bórico, 50mM de EDTA a um pH de 8,3. A separação foi realizada electroforeticamente num gel de agarose a 2%. Gel a 2% de agarose: 4g de agarose, 200 mL de TBE 1x, 8  $\mu$ L de midorigreen advance (*Genetics*). Assim colocou-se 7  $\mu$ L de produto amplificado com 3  $\mu$ L de tampão de corrida (loading buffer 5X da Promega). Colocou-se simultaneamente um marcador de pesos moleculares de DNA de 100 bp (*ThermoScientific*). A separação decorreu durante cerca de 60 minutos, utilizando uma

diferença de potencial de 110 V/cm. Por último, as bandas eram visualizadas e fotografadas sobre luz ultravioleta.

### 2.6. Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado utilizando o protocolo de *SureClean Plus* da *Bioline*.

### 2.7. Sequenciação de DNA

A sequenciação dos produtos de PCR amplificados foi realizada na STAB VIDA<sup>1</sup>, após envio dos produtos devidamente acondicionados. O método de sequenciação usado foi o método de Sanger.

O alinhamento das sequências foi realizado mediante a aplicação Multalin<sup>2</sup> (Corpet, 1988).

Realizou-se o alinhamento das sequências em comparação com as sequências de nucleótidos com os genes em análise, gene *pfarps10* PF3D7\_1460900.1, gene *pfmdr2* PF3D7\_1447900, gene *pfmdr1* PF3D7\_0523000 e gene *pfk13* PF3D7\_1343700 que se encontram na base de dados PlasmoDB.

---

<sup>1</sup> Disponível em: <http://www.stabvida.com/pt/>

<sup>2</sup> Disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>



# **3.Resultados**

### 3. Resultados

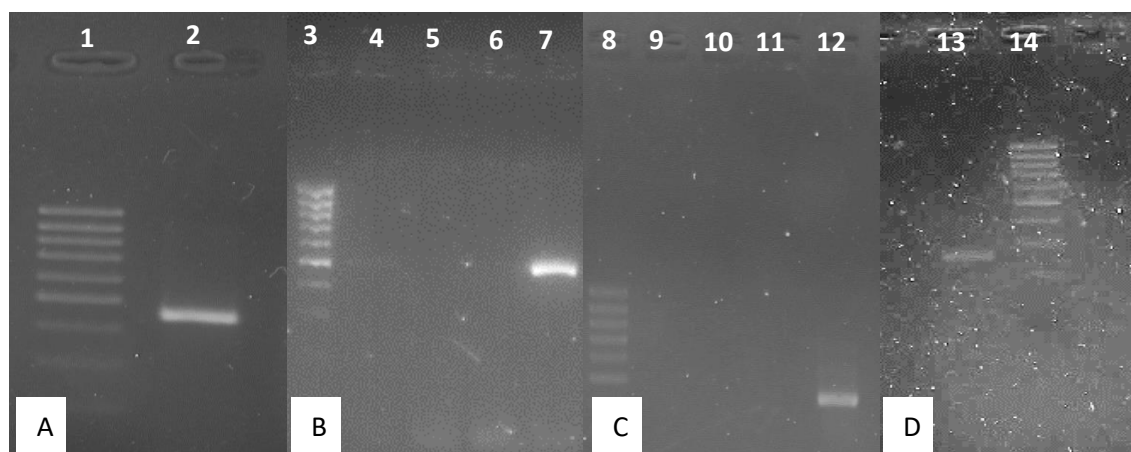
Este trabalho contribuiu para completar a caracterização de um conjunto de 30 amostras, iniciada em um trabalho anterior.

#### 3.1. Características dos isolados *P. falciparum* em estudo

Foram analisadas 30 amostras (isolados) recolhidas de pacientes com idades compreendidas entre 7 e 35 anos provenientes da capital de Timor-Leste, Díli, correspondentes ao período entre 2012 e 2013.

Em 4 das amostras o PCR para discriminar espécies permitiu concluir que seriam negativas para a infecção com *P. falciparum*.

No que diz respeito à análise do gene *pfmdr1* foram amplificados 2 fragmentos por cada amostra de forma a analisar os codões 84, 184 e 1246, sendo que na figura 4 (A) e (B) estão representados exemplos desses fragmentos respectivamente. No gene *pfmdr2* apenas foi amplificado um fragmento por amostra, figura 4 (C), e o mesmo aconteceu com o gene *pfarps10*, figura 4 (D).



**Figura 4:** Exemplos de géis de electroforese de cada gene.

- A) 1- Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 2- Fragmento de *pfmdr1* 86/184. B) 3 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 4,5,6 – Poço vazio; 7 - Fragmento de *pfmdr1* 1246. C) 8 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 9,10,11 – Poço vazio; 12 - Fragmento de *pfmdr2*. D) 13 - Marcador de pesos moleculares de 100 bp; 14 - Fragmento de *pfarps10*.

### 3.2.Características dos primers e condições de amplificação

Na tabela 3 é possível observar todos os primers usados e as condições de amplificação para cada fragmento e gene de interesse.

Para realizar a amplificação dos vários fragmentos de interesse nos diferentes genes, *pfmdr1*, *pfmdr2*, *pfarps10* e *pfk13* utilizou-se os protocolos de PCR descritos anteriormente em (Lobo et al.,2014) (48) e (Escobar et al.,2015) (49) com algumas alterações. Para o gene *pfmdr1* a temperatura de desnaturação inicial foi de 94°C durante 2 minutos, para *pfmdr2*, *pfarps10* e *pfK13* foi de 95°C durante 3 minutos. Para todos os genes o passo de extensão final foi de 72°C 3 min.

### 3.Resultados

**Tabela 3:** Primers e condições de amplificação.

Gene (SNP)	Reacção	Primers	Fragmento (bp)	Temp. hibrid. (°C)	Nº ciclos	Hibridação
<i>pfmdr1</i> (86/184)	1º	<b>86OF</b> 3'-ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG-5'	755	51	10	30 sec
		<b>184R</b> 3'-GTCTTTTCTCCACAAT-5'		50	35	
	2º	<b>86NF</b> 3'-GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA-5'	462	56	10	
		<b>86A3</b> 3'-ACTTTCTTATTACATATGACACCACAAA-5'		53	35	
<i>pfmdr1</i> (1246)	1º	<b>1246F</b> 3'-GGAGAAACAGGTAGTGGAAAATC-5'	491	55	10	30 sec
		<b>1246R</b> 3'-CAGAGAATAGCTATAGCTAG-5'				
	2º	<b>1246F</b> 3'-GGAGAAACAGGTAGTGGAAAATC-5'	474	50	35	
		<b>1246NR</b> 3'-GCTTATCAGGTGGACAAAAACAG-5'				
<i>pfmdr2</i> (423 484 492)	1º	<b>Mdr2F2</b> 3'-TCTCCGATATATTTAGGTTGGG-5'	722	58	10	1 min
		<b>Mdr2R2</b> 3'-AGGAAGGATCAGATCCAGGTAC-5'		50	30	
	2º	<b>Mdr2F2</b> 3'-TCTCCGATATATTTAGGTTGGG-5'	472	55	10	
		<b>Mdr2R1</b> 3'-CCATCTCATTTGCTTTTGTTTC-5'		50	30	
<i>pfarps10</i> (127)	1º	<b>arpsF2</b> 3'-CCCAAAAGACAATAAGAAAGAG-5'	279	55	10	1 min
		<b>arpsR1</b> 3'-ATAATTTATTCTGCTTACATTCAG-5'				
	2º	<b>arpsF2</b> 3'-CCCAAAAGACAATAAGAAAGAG-5'	279	50	30	
		<b>arpsR1</b> 3'-ATAATTTATTCTGCTTACATTCAG-5'				
<i>pfK13</i>	1º	<b>KelchF</b> 3'-GTGTAGAATATTTAAATTC-5'	483	56	10	1 min
		<b>Kelch R</b> 3'-GGTGAGAGATAAATTCTAT-5'		50	35	
	2º	<b>KelchF</b> 3'-GTGTAGAATATTTAAATTC-5'	483	51	10	
		<b>Kelch R</b> 3'-GGTGAGAGATAAATTCTAT-5'		50	35	

**bp** pares de bases; **temp.** temperatura; **hibrid.** hibridação; **sec.** segundos; **min.** minutos;

### 3.3.Prevalência dos polimorfismos associados à resistência de *P. falciparum* aos ACTs

Para identificação de polimorfismos (SNPs) nos codões de interesse 86, 184 e 1246 do gene *pfmdr1* as sequências dos fragmentos do gene *pfmdr1* de cada amostra foram comparadas com a sequência do gene *P. falciparum* (PF3D7\_0523000) depositada na base PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>). A prevalência dos SNPs identificados é apresentada na tabela 4 e figura 5. Neste gene os alelos mais prevalentes são o forma selvagem (*wild-type*, WT): N86 85%; F184 54,2% e D1246 100% (Tabela 4).

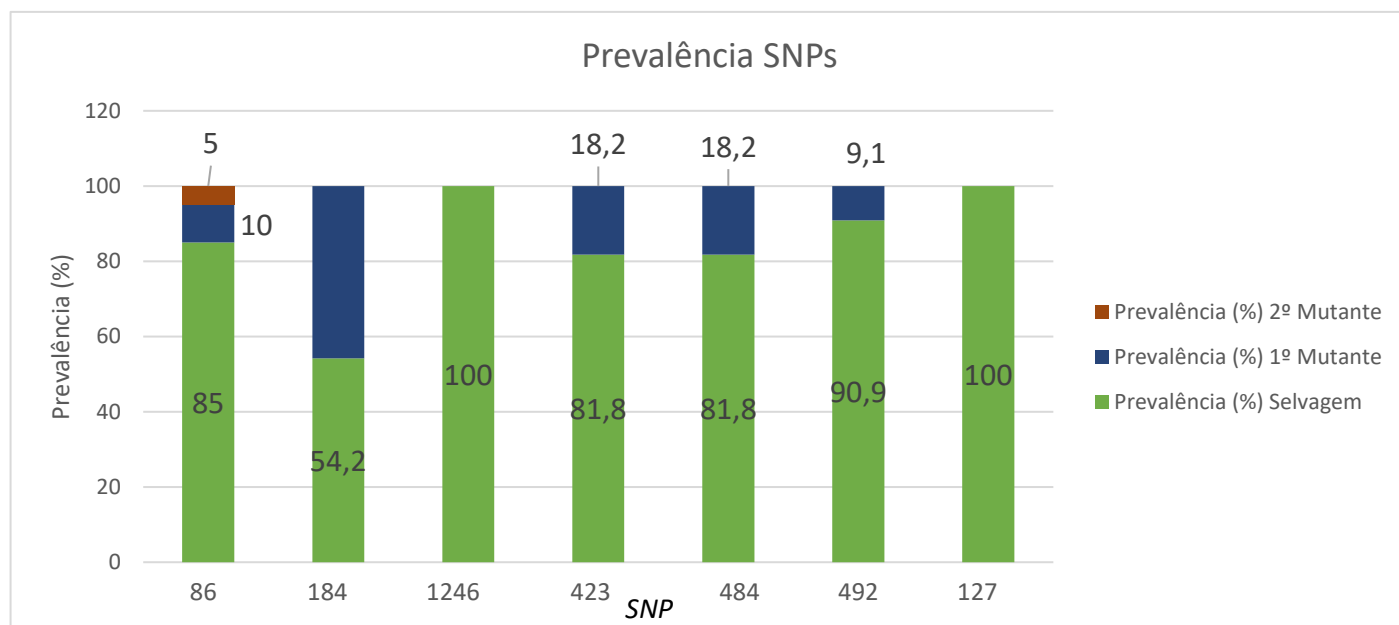
**Tabela 4:** Prevalências dos diferentes genes avaliados.

<i>pfmdr1</i>																<i>pfmdr2</i>				<i>pfarps10</i>	
Codões	86			184		1246		423		484		492		127							
Aminoácidos	F	Y	N	F	Y	D	Y	F	Y	T	I	I	V	V	M						
Prevalência (%)	10	5	85	54,2	45,8	100	0	81,8	18,2	81,8	18,2	90,9	9,1	100	0,0						

Os SNPs no gene *pfmdr2* foram analisados alinhando as sequências das amostras com a sequência de *pfmdr2* ID PF3D7\_1447900. Para os codões 423, 484 e 492 mantem-se esta tendência, em que o genótipo WT é maioritário (423 81,8%; 484 81,8% e 492 90,9%). (Tabela 4).

Relativamente ao gene *pfarps10* as sequências dos fragmentos de interesse foram também comparadas com gene *pfarps10* PF3D7\_1460900.1. Nenhuma amostra revelou genótipo mutante (Tabela 4).

Neste contexto as mutações de maior relevância são as do gene *pfmdr1*, pois são as que têm sido directamente associadas à terapêutica utilizada em Timor-Leste.



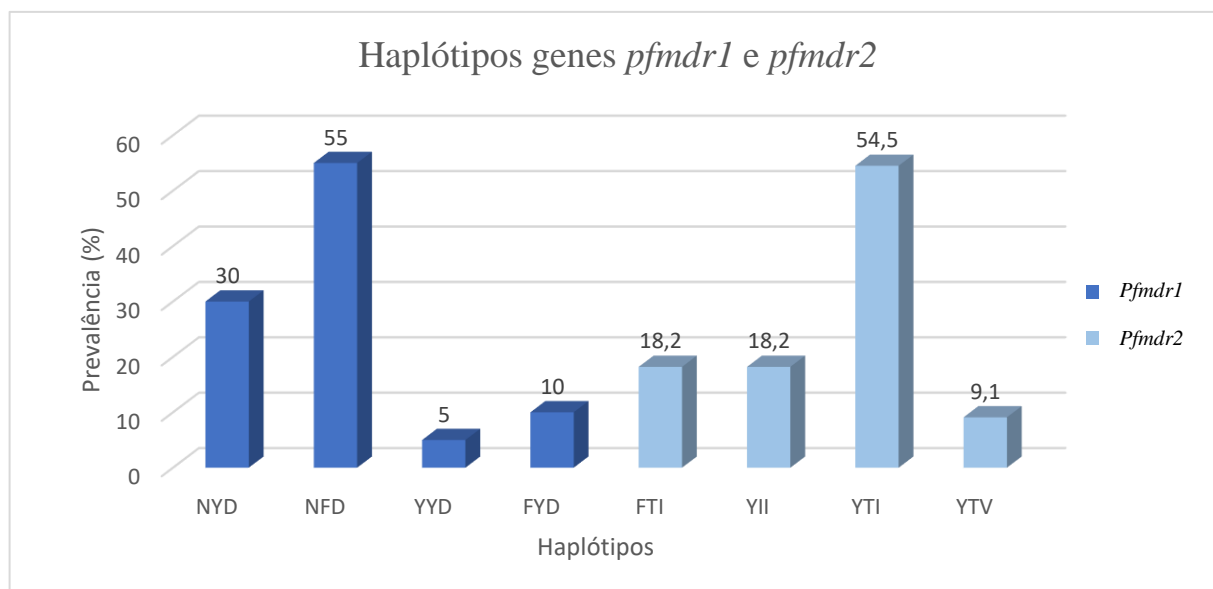
**Figura 5:** Gráfico de Prevalência dos diferentes SNPs nos codões analisados.

*pfmdr1* - **86**: Mutante 1 – Y; Mutante 2 – F; Selvagem – N; **184**: Mutante 1 – F; Selvagem – Y; **1246**: Selvagem – D.  
*pfmdr2* - **423**: Mutante 1 – Y; Selvagem – F; **484**: Mutante 1 – I; Selvagem – T; **492**: Mutante 1 – V; Selvagem – I.  
*pfarps10* - **127**: Selvagem – V.

A análise do gene *pfk13* não foi possível, pois após várias tentativas de amplificação nunca se obteve nenhum fragmento além do controle positivo.

### 3.4.Análise de haplótipos

Os haplótipos foram analisados nos genes *pfmdr1* e *pfmdr2* e apresentados na figura 6. Para o gene *pfmdr1* verificou-se o haplótipo NFD foi o mais prevalente, logo seguido do haplótipo NYD, presente em 6 amostras. No gene *pfmdr2* o haplótipo mais frequente e consequentemente com maior prevalência foi YTI



**Figura 6** – Prevalência dos haplótipos dos genes *pfmdr1* e *pfmdr2*.

*pfmdr1* (86/184/1246) – NYD, NFD, YYD e FYD.

*pfmdr2* (423/484/492) – FTI, YII, YTI e YTV.

# **4.Discussão e Considerações Finais**



### 4. Discussão e considerações finais

O principal objectivo deste estudo era desenhar e otimizar PCR para detecção de polimorfismos pontuais nos genes *pfmdr2* e *pfarps10*. No que diz respeito ao desenvolvimento do PCR, foi necessário aumentar gradualmente o tempo e temperatura de hibridação para permitir que os primers desenhados hidridassem na zona desejada, após várias tentativas conseguiu-se chegar às características de PCR desejadas de forma a obter o fragmento necessário.

O estudo dos marcadores moleculares de resposta ao fármaco companheiro utilizado no ACTs mostrou-se de extrema relevância, pois a resistência a estes fármacos encontra-se já disseminada por algumas áreas. Podendo assim colaborar para a falência terapêutica de ACTs, único regimento terapêutico actualmente eficaz na luta contra a malária, principalmente no Sudeste Asiático onde esta resistência começa a surgir. (43) Para tal deliniou-se um outro objectivo, estudar a presença de polimorfismos associados à resistência a ACT em *P. falciparum*, após a introdução dos mesmos como primeira linha terapêutica, em Timor Leste, determinando assim a prevalência de SNPs nos genes *pfmdr1*, *pfmdr2* e *pfarps10* de *P. falciparum*.

Ao analisar os vários genes foi necessário ter em conta que a primeira linha de tratamento em Timor-Leste é artemether+lumefantrina (AL). (25) As prevalências de determinados polimorfismos em populações de parasitas têm um grande impacto no tratamento dos indivíduos, determinando a probabilidade de sucesso da terapêutica. (51)

Os polimorfismos no codão 86 mostraram ter grande relevância na susceptibilidade a vários fármacos. (44) Ao analisar o codão 86 do gene *pfmdr1* constatou-se que o alelo prevalente era o selvagem, N86, que estava presente em 85% das amostras. Este resultado está de acordo com estudos anteriores onde a elevada pressão exercida por AL selecciona este alelo, N86, e tem sido associado com a diminuição da sensibilidade a lumefantrina e um aumento na prevalência do mesmo tem sido observado em infecções recorrentes que surgiram depois do tratamento com AL.(9) (10) (12) (44)

Vários investigadores concluíram que o polimorfismo N86Y estava associado com a diminuição da susceptibilidade a CQ e amodiaquina. (44) Ou seja a selecção do alelo 86Y tem sido associados com uma alta resistência a CQ, uma vez que este fármaco já não é utilizado como primeira linha de tratamento em Timor-Leste, pode justificar os

## 4. Discussão e Considerações Finais

nossos resultados em que este polimorfismo não foi muito observado. (46) Um estudo de eficácia terapêutica recente mostrou que o alelo N86 estava associado a uma eliminação lenta dos parasitas da corrente sanguínea tratados com artesunato como monoterapia. (44) Adicionalmente, tem sido observado que parasitas com o genótipo N86 têm uma probabilidade 4,7 vezes maior de permitir que exista uma falência da terapêutica depois de um tratamento com AL do que parasitas com o genótipo 86Y. (12) (49) Esta associação pode estar relacionada com o facto dos parasitas portadores deste alelo, N86, terem capacidade de sobreviver e multiplicar-se sob concentrações sanguíneas de lumefantrina (LUM) mais elevadas. (12)

Em África foi realizado um estudo em que a prevalência do polimorfismo N86 aumentava independentemente do regime terapêutico adoptado, sugerindo assim que outros factores além da pressão do fármaco podem influenciar a prevalência e distribuição destes alelos. (51)

Ainda relativamente ao *pfmdr1* alguns estudos constatarem que o SNP Y184F podia desempenhar um papel na mediação da resistência a vários fármacos. (6) pelo que fomos também analisar este alelo. Ao calcular as prevalências dos alelos neste codão verificou-se que a variante mais prevalente é Y184, tirosina, que corresponde ao codão selvagem, estando presente em 54,2% amostras. Alguns ensaios verificaram que com o uso de AL como primeira linha de tratamento em vários países a prevalência do polimorfismo 184F aumentou significativamente. (51) (49) Este polimorfismo tem também estado associado com a diminuição da susceptibilidade *in vitro* a mefloquina. (10) Este polimorfismo mostrou ser seleccionado depois do tratamento com AL, o que corrobora os dados analisados neste trabalho, indicando uma diminuição na eficácia do fármaco companheiro (LUM), facilitando a emergência de novos focos de resistência a artemisinina. (43) (49)

Por último o codão 1246 de *pfmdr1* também foi analisado. Verificou-se então que o único aminoácido existente era selvagem, aspargina, D1246. Alguns autores observaram que parasitas que comportam a variante selvagem são seleccionados pelo tratamento com AL, enquanto que parasitas com a variante mutada são parcialmente resistentes ao tratamento com artesunato+amodiaquina (AS-AQ). (49) Uma vez que a terapêutica actual em Timor-Leste é AL os nossos resultados suportam estas observações.

## 4. Discussão e Considerações Finais

Estudos anteriores verificaram que países com regimes terapêuticos de primeira linha de AL tinham o alelo mutante, 1246Y, com uma baixa ou inexistente prevalência. (49)

É importante analisar os haplótipos dos diferentes genes para ter uma visão mais abrangente do impacto dos ACTs num gene, pois a selecção que um fármaco pode actuar num haplótipo ao invés de um único polimorfismo. (9) Assim sendo foram analisados os haplótipos dos genes *pfmdr1* e *pfmdr2* calculando as suas prevalências.

No gene *pfmdr1* observou-se uma prevalência do haplótipo NFD. Segundo alguns estudos, o haplótipo NFD está associado à pressão selectiva efectuada pelo tratamento com AL. (9) (46) A redução de susceptibilidade à lumefantrina tem estado também associada à presença deste haplótipo, NFD. (44) (49) (51) Um estudo recente realizado na Tanzânia em pacientes com re-infecções após tratamento estimou que os parasitas que tinham o haplótipo NFD eram capazes de resistir a concentrações de lumefantrina 15 vezes maiores que parasitas com o haplótipo YYY. Indicando que uma vez que lumefantrina seleciona para o primeiro haplótipo estes vão-se tornando cada vez mais resistentes ao fármaco. (49) Verificou-se também a presença do haplótipo NYD em um número considerável de amostras. Este é um haplótipo que também tem estado associado à redução da sensibilidade a lumefantrina, com os parasitas a adquirirem alguma tolerância. (44) (47)

No nosso estudo os haplótipos YYD e FYD foram também encontrados, mas com uma prevalência menor. Estes são haplótipos aparentemente selecionados pelo tratamento com CQ ou AQ (43) (46), uma vez que estes fármacos já não constituem a primeira linha de tratamento em malária não complicada em Timor-Leste é espectável que a prevalência dos haplótipos por nós encontrada acima mencionados não seja elevada.

Relativamente ao gene *pfmdr2*, este gene tem sido associado ao efluxo de metais pesados e resistência a cádmio, assim como tem implicado no transporte de folatos e sulfadoxina para fora do parasita. (37) (50) (71) O papel deste transportador na resistência a antimaláricos continua pouco conhecido, no entanto o aumento da transcrição deste foi observado em linhas de parasitas resistentes a cloroquina. (37) (52) (55) Alguns estudos acrescentam ainda que o SNP F423Y de *pfmdr2* tem estado associado ao efluxo de pirimetamina no parasita. (55) Vários investigadores têm colocado a hipótese deste gene aumentar o fitness do parasita de forma a compensar os efeitos deletérios das mutações no gene *pfk13*, aumentando assim o nível de resistência aos derivados da artemisinina e

## 4. Discussão e Considerações Finais

mediando a resistência em amostras anteriormente tratadas com antimaláricos. (12) (51) (52) Um estudo genómico verificou ainda que os polimorfismos neste gene estavam ligados a um atraso na eliminação dos parasitas depois de terem recebido tratamento com ACTs. (53) No nosso trabalho foram estudados 3 codões, 423, 484 e 492. Verificou-se que a prevalência do aminoácido tirosina, Y, no codão 423 foi mais elevada, já no codão 484 o aminoácido mais prevalente foi a treonina, T, e por fim no codão 492 a isoleucina, I. Uma vez que não existe muita informação disponível acerca do impacto destes polimorfismos na resistência a antimaláricos apenas se pode afirmar que existe claramente uma selecção do alelo selvagem em todos os codões. (52) (55) O haplótipo mais encontrado neste gene foi YTI, no entanto a distribuição aqui foi mais equilibrada. Alguns estudos afirmam que a deleção deste gene no parasita poderia resultar numa acumulação do antimalárico no parasita, levando a um fenótipo de sensibilidade aumentado. No entanto o gene *pfmdr2* não parece influenciar do mesmo modo o comportamento de sensibilidade à LUM. (54) Em relação ao seu efeito sobre a terapêutica utilizada em Timor-Leste, este tem sido associado à resistência aos derivados de artemisinina, assim como à presença de mutações no gene *pfk13*. Ou seja, aumenta o fitness dos parasitas de forma a compensar os efeitos deletérios das mutações em *pfk13*, conseguindo assim aumentar ou mediar o nível de resistência a derivados da artemisinina. (12) (37)

Por último, o gene *pfarps10* encontra-se numa situação inicial de análise, pois não existem evidências suficientemente fortes acerca do papel deste gene na resistência a ACTs. No nosso trabalho estudou-se o codão V127M e verificou-se que o único aminoácido presente era a valina, V, a variante selvagem. Este tal como *pfmdr2* tem estado associado à presença de mutações no gene *pfk13*. (12) (37) Este gene pode também desempenhar o papel de aviso de que parasitas sensíveis irão adquirir mutações no gene *pfk13*, passando assim primeiro por uma mutação neste gene (36). Alguns estudos sugerem também que o alelo V127M é raro em algumas populações de África podendo ter surgido da evolução genética de parasitas no sudeste Asiático. (53) O facto de não termos detectado formas mutantes deste alelo nas amostras de Timor –leste pode dever-se a o número de amostras analisadas ser baixo.

Embora não exista registo de falências terapêuticas em Timor-Leste causadas por parasitas resistentes, segundo os resultados obtidos, é extremamente importante que esta

#### 4. Discussão e Considerações Finais

vigilância molecular permaneça, não só para continuar a garantir a eficácia dos programas de controlo de malária, como de permitir que o contexto de pré-eliminação que Timor-Leste se encontra continue eficaz.

De todas as amostras apenas 20 amplificaram para a marca 86 do gene *pfmdr1*, já no codão 184 verificou-se a amplificação de 24 amostras. O mesmo não se verificou na amplificação das amostras para o codão 1246 do *pfmdr1* em que 25 amplificaram. No gene *pfmdr2* foram estudados 3 codões sendo eles 423, 484 e 492 em que foi possível amplificar 11 amostras. No gene *pfarps10* estudou-se o codão 127 com 12 amostras amplificadas. Por limitação de tempo não nos foi possível desenvolver/optimização das condições de PCR de forma a obter amplificação para no total das 26 amostras positivas para *P. falciparum*. Pela mesma razão não nos foi possível comparar as frequências dos SNPs antes e depois da introdução dos ACTs em Timor – Leste.

Segundo os nossos resultados, o gene de maior preocupação neste contexto é o gene *pfmdr1*, pois tem sido o mais associado à terapêutica AL, utilizada em Timor-Leste.

Embora ainda não estejam documentadas falências terapêuticas em Timor-Leste causadas por resistência de parasitas aos antimaláricos é importante que se continue a fazer uma vigilância das mutações que conferem resistência, pois só assim se pode garantir a eficácia dos programas de controlo de malária implementados, no contexto de pré-eliminação da malária no qual se encontra Timor-Leste.

# **5.Referências Bibliográficas**

### 5. Referências Bibliográficas:

- 1) *World Health Organization (WHO). Malaria Key Facts*. WHO 2018 [Acesso em 11/Novembro/2018]. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- 2) Fairhurst, RM. & Dondorp, AM. 2016. *Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. *Microbiol Spectr*, 4(3).
- 3) Amato, R., Lim, P., Miotto, O., Amaratunga, C., Dek, D., Pearson, RD., et al. *Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperaquine failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study*. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:164–173. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- 4) Phillips, MA., Burrows, JN., Manyando, C., Huijsduijnen, VRH., Voorhis, VWC. & Wells, TNC. *Malaria*. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Aug 3;3. 17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- 5) *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Malaria Biology*. CDC 2018 [Acesso em 11/Setembro/2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- 6) Xu, C., Wei, Q., Yin, K., Sun, H., Li, J., Xiao, T., Kong, X., Wang, Y., Zhao, G., Zhu, S., Kou, J., Yan, G. & Huang, B. (2018). *Surveillance of Antimalarial Resistance Pfprt, Pfmdr1, and Pfkclch13 Polymorphisms in African Plasmodium falciparum imported to Shandong Province, China*. *Scientific Reports*. 8. 10.1038/s41598-018-31207-w.
- 7) Ocan, M., Akena, D., Nsoby, S., Kamya, MR., Senono, R., Kinengyere, AA. & Obuku, E. (2018). *K13-propeller gene polymorphisms in Plasmodium falciparum parasite population: a systematic review protocol of burden and associated factors*. *Systematic Reviews*. 7. 10.1186/s13643-018-0866-7.

## 5.Referências Bibliográficas

- 8) Lawal, B., Shittu, O., Abubakar, A. & Kabiru, AY. (2018). *Human Genetic Markers and Structural Prediction of Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Gene (pfmdr1) for Ligand Binding in Pregnant Women Attending General Hospital Minna.* Journal of Environmental and Public Health. 2018. 1-13. 10.1155/2018/3984316.
- 9) Taylor, A., Flegg, J., Holmes, CC., Guerin, P., Sibley, CH., Conrad, MD., Dorsey, G. & Rosenthal, PJ. (2016). *Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine Exert Inverse Selective Pressure on Plasmodium Falciparum Drug Sensitivity-Associated Haplotypes in Uganda.* Open Forum Infectious Diseases. 4. ofw229. 10.1093/ofid/ofw229.
- 10) Srimuang, K., Miotto, O., Lim, P., Fairhurst, RM., Kwiatkowski, DP., Woodrow, C. & Imwong, M. (2018). *Analysis of anti-malarial resistance markers in pfmdr1 and pfprt across Southeast Asia in the Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration.* Malaria Journal. 17. 10.1186/s12936-018-2464-5.
- 11) Mukherjee, A., Bopp, S., Magistrado, P., Wong, W., Daniels, R., Demas, A., Schaffner, S., Amaratunga, C., Lim, P., Dhorda, M., Miotto, O., Woodrow, C., Ashley, EA., Dondorp, AM., White, NJ., Wirth, D., Fairhurst, R. & Volkman, S. (2017). *Artemisinin resistance without pfkelch13 mutations in Plasmodium falciparum isolates from Cambodia.* Malaria Journal. 16. 10.1186/s12936-017-1845-5.
- 12) Gil, JP & Krishna, S. *pfmdr1 (Plasmodium falciparum multidrug drug resistance gene 1): a pivotal factor in malaria resistance to artemisinin combination therapies.* Expert Rev Anti Infect Ther. 2017; 15:527–543. doi: 10.1080/14787210.2017.1313703.
- 13) Nyunt, MH., Hlaing, T., Oo, HW., Tin-Oo, L-LK., Phway, HP., Wang, B, et al. *Molecular assessment of artemisinin resistance markers, polymorphisms in the K13 propeller, and a multidrug-resistance gene in the eastern and western border areas of Myanmar.* Clin Infect Dis. 2015;60:1208–1215. doi: 10.1093/cid/ciu1160.



## 5.Referências Bibliográficas

- 14) Bloland, PB. “*Drug resistance in malaria.*” *British medical journal* 1 5481 (1966): 187.
- 15) *World Health Organization* (WHO). Regional Office for South-East Asia. (2016). *WHO Country Cooperation Strategy 2015-2019: Timor-Leste*. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/246258>
- 16) *World Health Organization*. (WHO). (2011) *External Review of the National Malaria Control Programme in Timor Leste* [Acesso em 20/Agosto/2018]. Disponível em: [http://www.searo.who.int/entity/malaria/documents/MPR\\_Timor\\_Leste\\_2011/en/](http://www.searo.who.int/entity/malaria/documents/MPR_Timor_Leste_2011/en/)
- 17) de Almeida, A., Arez, A., Cravo, PV. & Rosario, V. (2009). *Analysis of genetic mutations associated with anti-malarial drug resistance in Plasmodium falciparum from the Democratic Republic of East Timor*. *Malaria journal*. 8. 59. 10.1186/1475-2875-8-59.
- 18) Gupta, H., Macete, E., Bulo, H., Salvador, C., Warsame, M., Carvalho, E., Ménard, D., Ringwald, P., Bassat, Q., Enosse, S. & Mayor, A. (2018). *Drug-Resistant Polymorphisms and Copy Numbers in Plasmodium falciparum, Mozambique, 2015*. *Emerging Infectious Diseases*. 24. 40-48. 10.3201/eid2401.170864.
- 19) Ljolje, D., Dimbu, PR., Kelley, J., Goldman, I., Nace, D., Macaia, A., Halsey, ES., Ringwald, P., Fortes, F., Udhayakumar, V., Talundzic, E., Lucchi, N. & Plucinski, M. (2018). *Prevalence of molecular markers of artemisinin and lumefantrine resistance among patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in three provinces in Angola, 2015*. *Malaria Journal*. 17. 10.1186/s12936-018-2233-5.
- 20) Smith, S., Juana, A., Kamara, FRY., Sahr, MM., Samai, AS., Swaray, DM. & Marian, YW. “*Efficacy of artemisinin-based combination therapies and prevalence of molecular markers associated with artemisinin, piperazine and sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Sierra Leone.*” *Acta tropica* (2018).

## 5.Referências Bibliográficas

- 21) World Health Organization. (2002) Health Profile Democratic Republic of Timor-Leste. *World Health Organization*. Disponível em: [http://www.searo.who.int/timorleste/publications/Health\\_Information\\_TLS\\_Health\\_profile\\_RDTL.pdf](http://www.searo.who.int/timorleste/publications/Health_Information_TLS_Health_profile_RDTL.pdf)
- 22) World Health Organization. WHO-TL (2018). Profile Timor-Leste – *World Malaria Report* 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>
- 23) Governo de Timor-Leste. *O plano estratégico do sector de saúde nacional 2011-2030*. [Web Site]. Timor-Leste: GOV; 2011 [actualizado: 29/05/2011; Acesso:20/09/2018] Disponível em: [http://timor-leste.gov.tl/wp-content/uploads/2012/02/Plano-Estrategico-de-Desenvolvimento\\_PT1.pdf](http://timor-leste.gov.tl/wp-content/uploads/2012/02/Plano-Estrategico-de-Desenvolvimento_PT1.pdf)
- 24) Martins, J., Zwi, A., Hobday, K., Bonaparte, F. & Kelly, P. (2013). *Changing the malaria treatment protocol policy in Timor-Leste: An examination of context, process, and actors' involvement*. Health research policy and systems / BioMed Central. 11. 16. 10.1186/1478-4505-11-16.
- 25) World Health Organization. WHO-TL (2018). *Profile Timor-Leste*. Disponível em: <https://www.who.int/countries/tls/en/>
- 26) World Health Organization. (WHO) *Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests* WHO/CDS/GMP/2018.01 [Atualizado em: 2018; Acesso: 20/11/2018] Disponível em:<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259870/WHO-CDS-GMP-2018.01-eng.pdf;jsessionid=3BCF9964F51BF90B4CB5E250AB79D0BF?sequence=1>
- 27) World Health Organization. (WHO);. *Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual*. ISBN: 9789241502092 Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44657/9789241502092\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44657/9789241502092_eng.pdf?sequence=1)

## 5.Referências Bibliográficas

- 28) *World Health Organization. (WHO) (2015). Control and elimination of plasmodium vivax malaria: a technical brief* ISBN: 978 92 4 150924 4
- 29) *World Health Organization. (WHO) (2014) Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings* WHO/HTM/GMP/2014.7
- 30) *World Health Organization. (WHO) (2014) Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings* WHO/HTM/GMP/2014.4
- 31) *World Health Organization. (2015) Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition.(WHO).* ISBN: 978 92 4 154912 7 Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127\\_eng.pdf;jsessionid=9694EC0E322F3E5D9F009A57DC641BCE?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf;jsessionid=9694EC0E322F3E5D9F009A57DC641BCE?sequence=1)
- 32) *World Health Organization. Malária: Antimalarial drug efficacy and drug resistance.* [Web Site]. WHO; 2018 [Acesso:25/09/2018] Disponível em: [https://www.who.int/malaria/areas/treatment/drug\\_efficacy/en/](https://www.who.int/malaria/areas/treatment/drug_efficacy/en/)
- 33) *World Health Organization. (2016) Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance – April 2016 Status Report. World Health Organization.* WHO/HTM/GMP/2016.05
- 34) *World Health Organization (WHO). 2018. Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual. Geneva;; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272284/9789241565578-eng.pdf?ua=1>
- 35) *World Health Organization (WHO) 2010. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.* ISBN 978 92 4 150047 0 Disponível em:[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470_eng.pdf?sequence=1)

## 5.Referências Bibliográficas

- 36) Miotto, O., Amato, R., Ashley, EA., MacInnis, B., Almagro-Garcia, J., Amaratunga, C., Lim, P., Mead, D., Oyola, SO. & Dhorda, M., et al. *Genetic architecture of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum*. Nat Genet. 2015;47(3):226–234. doi: 10.1038/ng.3189.
- 37) Briolant, S., Bogreau, H., Gil, M., Bouchiba, H., Baret, E., Amalvict, R., Rogier, C. & Pradines, B. (2012). *The F423Y Mutation in the pfmdr2 Gene and Mutations N51I, C59R, and S108N in the pfdhfr Gene Are Independently Associated with Pyrimethamine Resistance in Plasmodium falciparum Isolates*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 56. 2750-2. 10.1128/AAC.05618-11.
- 38) Bopp, S.E., Magistrado, P.A., Wong, W.P., Schaffner, S.F., Mukherjee, A., Lim, P., Dhorda, M., Amaratunga, C., Woodrow, C.J., Ashley, E.A., White, N.J., Dondorp, A.M., Fairhurst, R.M., Arie, F., Ménard, D., Wirth, D.F., & Volkman, S.K. (2018). *Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperazine resistance among Cambodian Plasmodium falciparum*. Nature Communications.
- 39) Loesbanluechai, D., Kotanan, N., de Cozar, C., Kochakarn, T., Ansbrosio, MR., Chotivanich, K., White, NJ., Wilairat, P., Lee, MCS., Gamo, FJ., Sanz, LM., Chookajorn, T. & Kumpornsin, K. (2018). *Overexpression of plasmepsin II and plasmepsin III does not directly cause reduction in Plasmodium falciparum sensitivity to artesunate, chloroquine and piperazine*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 9. 10.1016/j.ijpddr.2018.11.004.
- 40) Voumbo-Matoumona, D., Akiana, J., Madamet, M., Kouna, L-C., Lekana-Douki, J. & Pradines, B. (2018). *High prevalence of Plasmodium falciparum antimalarial drug resistance markers in isolates from asymptomatic patients from the Republic of the Congo between 2010 and 2015*. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 14. 10.1016/j.jgar.2018.08.003.
- 41) Muiruri, P., Juma, D., Ingasia, L., Chebon, L., Opot, B., Ngalah, BS., Cheruiyot, J., Andagalu, B., Akala, H. & Kamau, E. (2018). *Selective sweeps and genetic lineages of*

## 5.Referências Bibliográficas

*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance (*pfmdr1*) gene in Kenya. Malaria Journal. 17. 10.1186/s12936-018-2534-8.

42) Mbaye, A., Dieye, B., Ndiaye, Y., Bei, A., Muna, A., Deme, A., Yade, MS., Diongue, K., Gaye, A., Ndiaye, IM., Ndiaye, T., Sy, M., Diallo, M., Badiane, A., Ndiaye, M., Seck, M., Sy, N., Koita, O., Krogstad, DJ. & Ndiaye, D. (2016). *Selection of N86F184D1246 haplotype of Pfmdr1 gene by artemether–lumefantrine drug pressure on Plasmodium falciparum populations in Senegal*. Malaria Journal. 15. 10.1186/s12936-016-1490-4.

43) Lobo, E., Sousa, B.D., Rosa, S., Figueiredo, P.A., Lobo, L.T., Pateira, S., Fernandes, N.E., & Nogueira, F. (2014). *Prevalence of pfmdr1 alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisinin-based combination therapy*. Malaria Journal.

44) Nguetse, C., Adegnika, A., Agbenyega, T., Ogutu, B., Krishna, S., Kremsner, PG. & Velavan T. (2017). *Molecular markers of anti-malarial drug resistance in Central, West and East African children with severe malaria*. Malaria Journal. 16. 10.1186/s12936-017-1868-y.

45) Escobar, C., Pateira, S., Lobo, E., Lobo, L., Teodosio, R., Dias, F., Fernandes, N., Arez, A., Varandas, L. & Nogueira, F. (2015). *Polymorphisms in Plasmodium falciparum K13-Propeller in Angola and Mozambique after the Introduction of the ACTs*. PloS one. 10. e0119215. 10.1371/journal.pone.0119215.

46) Picot, S., Olliaro, P., Monbrison, F.D., Bienvenu, A., Price, R.N., & Ringwald, P. (2008). *A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria*. Malaria Journal, 8, 89 - 89.

47) Otienoburu, S. D., Suay, I., Garcia, S., Thomas, N. V., Srisutham, S., Björkman, A., & Humphreys, G. S. (2019). *An online mapping database of molecular markers of drug*

## 5.Referências Bibliográficas

*resistance in Plasmodium falciparum: the ACT Partner Drug Molecular Surveyor.* Malaria journal, 18(1), 12. doi:10.1186/s12936-019-2645-x

48) Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., & Brown, K.N. (1993). *Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections.* Molecular and biochemical parasitology, 58 2, 283-92

49) Okell, LC., Reiter, LM., Ebbe, LS., et al *Emerging implications of policies on malaria treatment: genetic changes in the Pfmdr-1 gene affecting susceptibility to artemether–lumefantrine and artesunate–amodiaquine in Africa* BMJ Global Health 2018;3:e000999.

50) Sanchez, C., Dave, A., Stein, WD. & Lanzer, M. (2010). *Transporters as mediators of drug resistance in Plasmodium falciparum.* International journal for parasitology. 40. 1109-18. 10.1016/j.ijpara.2010.04.001.

51) Chenet, SM., Okoth, SA., Kelley, J., Lucchi, N., Huber, CS., Vreden, S., Oliveira, MA., Barnwell, JW., Udhayakumar, V. & Adhin, MR. 2017. *Molecular profile of malaria drug resistance markers of Plasmodium falciparum in Suriname.* Antimicrob Agents Chemother 61:e02655-16.<https://doi.org/10.1128/AAC.02655-16>.

52) Nyunt, M.H., Soe, M.T., Myint, H., Oo, H.W., Aye, M.M., Han, S.S., Zaw, N.N., Cho, C., Aung, P.Z., Kyaw, K.T., Aye, T.T., San, N.A., Ortega, L.I., Thimasarn, K., Bustos, M.D., Galit, S., Hoque, M.R., Ringwald, P., Han, E., & Kyaw, M.P. (2017). *Clinical and molecular surveillance of artemisinin resistant falciparum malaria in Myanmar (2009–2013).* Malaria Journal. 16. 10.1186/s12936-017-1983-9.

53) Nyunt, M.H., Wang, B., Aye, K.M., Aye, K.H., Han, J.H., Lee, S., Han, K.T., Htut, Y.M., & Han, E. (2017). *Molecular surveillance of artemisinin resistance falciparum malaria among migrant goldmine workers in Myanmar.* Malaria Journal.

## 5.Referências Bibliográficas

- 54) Velden, M., Rijpma, S., Russel, F., Sauerwein, RW. & Koenderink JB. (2015). *PfMDR2 and PfMDR5 are dispensable for Plasmodium falciparum asexual parasite multiplication but change in vitro susceptibility to anti-malarial drugs*. Malaria journal. 14. 581. 10.1186/s12936-015-0581-y.
- 55) Rosenberg, E., Litus, I., Schwarzfuchs, N., Sinay, R., Schlesinger, P., Golenser, J., Baumeister, S., Lingelbach, K. & Pollack, Y. (2006). *pfmdr2 Confers Heavy Metal Resistance to Plasmodium falciparum*. The Journal of biological chemistry. 281. 27039-45. 10.1074/jbc.M601686200.
- 56) Maier AG., Matuschewski K., Zhang M., Rug M.. (2018) *Plasmodium falciparum* Trends in Parasitology , Volume 0 , Issue 0 , DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>
- 57) Koch, M., & Baum, J. (2016). *The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte – towards a reassessment of the host cell contribution*. Cellular microbiology.
- 58) Vaughan, A. & Kappe, S.H.I.. (2017). *Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 7. a025486. 10.1101/cshperspect.a025486.
- 59) Tweedell, R.E.; Qi, L.; Sun, Z. & Dinglasan, R.R. *Kupffer Cells Survive Plasmodium berghei Sporozoite Exposure and Respond with a Rapid Cytokine Release*. Pathogens 2018, 7, 91.
- 60) White NJ., Pukrittayakamee S., Tran HT., Faiz MA., Mokuolu, O. & Dondorp AM. (2014). *Malaria* (vol 383, pg 723, 2014). The Lancet. 383. 696-696.
- 61) Basu, S., & Sahi, P. (2017). *Malaria: An Update*. Indian journal of pediatrics. 84. 10.1007/s12098-017-2332-2.

## 5.Referências Bibliográficas

- 62) Cowman, A.F., Berry, D., & Baum, J. (2012). *The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell*. The Journal of cell biology.
- 63) World Health Organization. (WHO) (2012) *Global Malaria Programme management GLOBAL PLAN FOR INSECTICIDE RESISTANCE IN MALARIA VECTORS* World Health Organization 2012. ISBN: 978 92 4 156447 2
- 64) World Health Organization & Global Partnership to Roll Back Malaria. (2006). *Malaria vector control and personal protection : report of a WHO study group*. Geneva : World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/43425>
- 65) World Health Organization. (2017) *Malaria prevention works: let's close the gap - World Malaria Day 2017 – April 2017*. World Health Organization. WHO/HMT/GMP/2017.6
- 66) World Health Organization. (2001) *ANTIMALARIAL DRUG COMBINATION THERAPY* - Report of a WHO Technical Consultation World Health Organization, Geneva WHO, 2001
- 67) Wootton JC., Feng X., Ferdig M., Cooper RA., Mu J., Baruch DI., Magill AJ., Su, X. (2002). *Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum*. Nature. 418. 320-3. 10.1038/nature00813.
- 68) Roper C., Pearce R., Nair S., Sharp B., Nosten F., Anderson T. (2004). *Intercontinental Spread of Pyrimethamine-Resistant Malaria*. Science (New York, N.Y.). 305. 1124. 10.1126/science.1098876.
- 69) Noedl H., Se Y., Sriwichai S., Schaecher K., Teja-Isavadharm P., Smith B., Rutvisuttinunt W., Bethell D., Surasri S., Fukuda MM., Socheat D., Thap LC. (2010). *Artemisinin Resistance in Cambodia: A Clinical Trial Designed to Address an Emerging*



## 5.Referências Bibliográficas

*Problem in Southeast Asia*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 51. e82-9. 10.1086/657120.

70) World Health Organization. (2018) *Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy – April 2018 Status Report*. World Health Organization. WHO/CDS/GMP/2018.18

71) Martinelli A., Henriques G., Cravo P., Hunt P. (2011). *Whole genome re-sequencing identifies a mutation in an ABC transporter (mdr2) in a Plasmodium chabaudi clone with altered susceptibility to antifolate drugs*. International journal for parasitology. 41. 165-71. 10.1016/j.ijpara.2010.08.008.

72) Yapabandara, M., Sarmiento, R., Mota, M., Bosco, J., Martins, N. & RW, A. (2015). *Evidence-based malaria control in Timor Leste from 2006 to 2012*. Malaria Journal. (2015) 14:109. 10.1186/s12936-015-0614-6.

73) World Health Organization. (WHO) (2016). *Eliminating malaria*. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/205565>

74) Menard, D. & Dondorp, A. (2017). *Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 7. a025619. 10.1101/cshperspect.a025619.

75) World Health Organization. (WHO) (2015) *Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*. ISBN: 978 92 4 156499 1

76) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Malaria Diagnostic Tests*. CDC 2018 [Acesso em 20/Agosto/2018]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/diagnostic\\_tools.html#tabs-1-3](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnostic_tools.html#tabs-1-3)

## 5.Referências Bibliográficas

- 77) World Health Organization. (2018) *Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy – Agosto 2018 Status Report*. World Health Organization. WHO/CDS/GMP/2018.18
- 78) World Health Organization. (2009) *Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy*. WHO. ISBN 978 92 4 159753 1
- 79) Amaratunga, C., Neal, A.T., & Fairhurst, R. M. (2014) *Flow cytometry-based analysis of artemisinin- resistant Plasmodium falciparum in the ring-stage survival assay*. Antimicrob Agents Chemother. 58(8):4938-40.
- 80) Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S. et al. (2013) *Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies*. Lancet Infect Dis. 13(12):1043-9.
- 81) Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H., & Meshnick S. R. (2002) *Epidemiology of drug-resistant malaria*. Lancet Infect Dis. (4): 209- 218.
- 82) Ekland, E. H. & Fidock, D. A. (2007) *Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance*. Curr Opin Microbiol. 10(4): 363–370.
- 83) Wurtz N, Fall B, Pascual A, et al. *Role of Pfmdr1 in in vitro Plasmodium falciparum susceptibility to chloroquine, quinine, monodesethylamodiaquine, mefloquine, lumefantrine, and dihydroartemisinin*. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:7032–40. 10.1128/AAC.03494-14

## 5.Referências Bibliográficas

84) Gupta, A., Shah, P., Haider, A., Gupta, K., Siddiqi, M., Ralph, S. & Habib S.. (2014). *Reduced ribosomes of the apicoplast and mitochondrion of Plasmodium spp. and predicted interactions with antibiotics*. Open Biology. 4. 10.1098/rsob.140045.

85) Ross, L.S., Dhingra, S.K., Mok, S., Yeo, T., Wicht, K.J., Kumpornsin, K., Takala-Harrison, S.L., Witkowski, B., Fairhurst, R.M., Ariey, F., Ménard, D., & Fidock, D.A. (2018). *Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer Plasmodium falciparum resistance to the first-line antimalarial piperaquine*. Nature Communications.